

Aus der Klinik für Nephrologie und Internistische Intensivmedizin  
der Medizinischen Fakultät Charité - Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Auswirkungen des eNOS-G894T-Polymorphismus  
auf den Blutdruck und die Proteinurie bei Schwangeren

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

von

Sophia Hügler  
aus Freiburg im Breisgau

Datum der Promotion: 13.12.2019

## Vorwort

Anteile der vorliegenden Monographie wurden vorab publiziert unter dem Titel:

Hoher B, Chen YP, Hügle S, Repey J, Krause K, Slowinski T, Godes M, Schaeffele E, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Gossing G, Pfab T. *Impact of maternal endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy.* J Hum Hypertension 2008; 22 (9): 641-7.

# Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen .....	V
Tabellenverzeichnis.....	VII
Abbildungsverzeichnis .....	VIII
Kurzfassung.....	IX
Abstract .....	X
1. Einleitung .....	1
1.1. Endotheliale NO-Synthase .....	1
1.1.1. Die Entdeckung von Stickstoffmonoxid .....	1
1.1.2. Die NO-Synthase.....	2
1.1.3. Eigenschaften der endothelialen NOS (eNOS) .....	5
1.1.4. Der eNOS-Polymorphismus.....	7
1.1.5. Zelluläre Mechnismen von NO .....	7
1.2. Allgemeines zu NO und Schwangerschaft.....	9
1.2.1. Maternale systemische Zirkulation .....	9
1.2.2. Uteroplazentarer Blutfluss.....	10
1.2.3. Plazenta, Nabelschnur und Myometrium .....	10
1.3. Arterieller Hypertonus in der Schwangerschaft .....	11
1.3.1. Physiologische Blutdruckregulation in der Schwangerschaft.....	11
1.3.2. Pathologische Blutdruckregulation in der Schwangerschaft.....	11
2. Fragestellung .....	17
3. Studienpopulation und Methodik .....	18
3.1. Studiendesign .....	18
3.2. Studienteilnehmerinnen.....	18
3.2.1. Postpartale Datenerhebung.....	18
3.2.2. Asservierung von mütterlichem Blut .....	20
3.3. Methoden.....	20
3.3.1. DNA-Isolierung aus Vollblut .....	20
3.3.2. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) .....	22
3.3.3. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse.....	25
3.3.4. Agarose-Gelelektrophorese .....	26
3.3.5. Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte .....	27

3.4. Statistische Auswertung .....	28
4. Ergebnisse der statistischen Auswertung .....	29
4.1. Beschreibung des Studienkollektivs.....	29
4.1.1. Daten aus dem Mutterpass .....	29
4.1.2. Daten zu den geborenen Kindern .....	30
4.1.3. Anamnestisch erhobene Daten .....	30
4.2. Genotypenverteilung und Allelverteilung.....	31
4.3. Charakteristika der Mütter in Bezug auf den G894T-Polymorphismus .....	32
4.3.1. Alter und Body-Mass-Index.....	32
4.3.2. Diabetes mellitus .....	32
4.3.3. Positive Familienanamnese für arterielle Hypertonie .....	34
4.3.4. Fettstoffwechselstörungen.....	35
4.3.5. Nikotinkonsum.....	35
4.4. Arterieller Blutdruck, Proteinurie und Ödembildung in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps.....	36
4.4.1. Ödeme .....	36
4.4.2. Arterieller Blutdruck .....	37
4.4.3. Proteinurie .....	38
4.4.4. Kovarianzanalyse .....	39
4.4.5. Unterteilung in Allelträger und Nichtallelträger .....	40
5. Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung.....	41
6. Diskussion .....	42
6.1. Die Bedeutung des eNOS-Polymorphismus in der Schwangerschaft.....	42
6.2. Vergleich mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten .....	43
6.3. Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Studienergebnisse.....	44
7. Zusammenfassung .....	45
8. Quellenangaben.....	46
9. Eidesstattliche Versicherung .....	59
10. Lebenslauf .....	61
11. Publikation .....	62
12. Danksagung.....	63

## Abkürzungen

ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of variance (Varianzanalyse)
ANCOVA	Analysis of covariance (Kovarianzanalyse)
APGAR	Atmung, Puls, Grundtonus, Aussehen, Reflexe
Asp	Asparaginsäure
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BMI	Body-Mass-Index
bp	Basenpaare
CaM	Calmodulin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EDHF	Endothelium-derived hyperpolarisation factor
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FAM	Flavin-Adenin-Mononukleotid
G	Guanin
GFR	glomeruläre Filtrationsrate
Glu	Glutaminsäure
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
Häm	Eisen-Protoporphyrin IX
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase
kb	Kilobasen
LDL	Low Density Lipoprotein
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat

NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxid-Synthase
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Plated-derived growth factor
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin
T	Thymin
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	Umdrehungen
UV	ultraviolett

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1. Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen der Studienteilnehmerinnen .....	31
Tabelle 2. Mittelwerte von Alter und BMI der Studienteilnehmerinnen in Bezug auf ihren Genotyp .....	32
Tabelle 3. Häufigkeit von Diabetes mellitus der Studienteilnehmerinnen vor der Schwangerschaft bezogen auf den Genotyp.....	33
Tabelle 4. Häufigkeit von Diabetes mellitus der Studienteilnehmerinnen während der Schwangerschaft bezogen auf den Genotyp.....	33
Tabelle 5. Häufigkeiten von anamnestisch erhobenem Diabetes mellitus in der Familie der Studienteilnehmerinnen bezogen auf den Genotyp.....	34
Tabelle 6. Häufigkeit der arteriellen Hypertonie in der Familie der Studienteilnehmerinnen bezogen auf den Genotyp.....	34
Tabelle 7. Häufigkeit von Fettstoffwechselstörungen der Studienteilnehmerinnen bezogen auf den Genotyp .....	35
Tabelle 8. Nikotinkonsum in Bezug auf den Genotyp .....	36
Tabelle 9. Vergleich von Studienteilnehmerinnen mit und ohne Ödeme in Bezug auf den Genotyp im ersten, zweiten und dritten Trimenon der Schwangerschaft .....	37
Tabelle 10. Mittelwerte des systolischen Blutdrucks der Studienteilnehmerinnen in Beziehung zum Genotyp im ersten, zweiten und dritten Trimenon.....	38
Tabelle 11. Mittelwerte des diastolischen Blutdrucks der Studienteilnehmerinnen in Beziehung zum Genotyp im ersten, zweiten und dritten Trimenon.....	38

Tabelle 12. Mittelwerte der Proteinurie der Studienteilnehmerinnen in Bezug auf den Genotyp im ersten, zweiten und dritten Trimenon .....	39
Tabelle 13. Mittelwertvergleiche des systolischen und diastolischen Blutdrucks und der Proteinurie zwischen den Genotypen, Kovarianzanalyse (ANCOVA) .....	40
Tabelle 14. Unterteilung der Genotypen in Allelträger und Nichtallelträger in Bezug zum systolischen und diastolischen Blutdruck und der Proteinurie.....	41

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1. Biosynthese von Stickstoffmonoxid (Quelle: Stuehr, D.J. 2004. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. Journal of Nutrition. 134:2748-2751) .....	2
Abbildung 2. Schematischer Aufbau der eNOS, nNOS und iNOS mit Oxygenase- und Reduktasedomänen: Bindungsregion für Calmodulin (CaM), Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadenindinukleotid (FAD) und NADPH in der Reduktasedomäne, und Häm, Tetrahydrobiopterin (BH4) und L-Arginin in der Oxygenasedomäne (Quelle: Modifiziert durch Rojas, A. von Alderton, R.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function an inhibition. Biochem. J. 2001; 357:593-615) .....	4

## Kurzfassung

Hypertensive Erkrankungen in der Schwangerschaft tragen wesentlich zu Morbidität und Mortalität von Müttern und Neugeborenen bei. Sie sind multifaktorielle Erkrankungen, die sich aus Wechselwirkungen zwischen verschiedenen genetischen Einflüssen und Umweltfaktoren ergeben. Es wurde berichtet, dass die Aktivität der Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase in verschiedenen mütterlichen Geweben während einer normalen Schwangerschaft erhöht ist. Langfristige Inhibierung der NO-Synthase führt zu einem Präeklampsie-ähnlichen Syndrom. Polymorphismen des endothelialen NO-Synthase-Gens (NOS3), die die NO-Verfügbarkeit reduzieren, scheinen zu einer erhöhten Prädisposition hypertensiver Erkrankungen in der Schwangerschaft beizutragen.

NO, das durch die endotheliale NO-Synthase produziert wird, hemmt die Thrombozytenaktivierung und stellt einen entscheidenden Modulator für die Aufrechterhaltung der systemischen Vasodilatation der Mutter dar. Bei Präeklampsie wurde eine Verringerung der endothelialen NO-Synthaseaktivität in der Plazenta nachgewiesen. Lokal erzeugtes NO könnte erforderlich sein, um die endovaskuläre Invasion der Zytotrophoblasten zu fördern, welche bei der Präeklampsie beeinträchtigt ist. Die häufige NOS3-Variante G894T im Exon 7 (rs1799983) ist mit einer reduzierten basalen NO-Produktion assoziiert.

Diese genetische Assoziationsstudie wurde durchgeführt, um festzustellen, ob genetisch bedingte Veränderungen des Stickoxid-Systems mit klinischen Markern der Präeklampsie in Zusammenhang stehen. Eine große Anzahl von kaukasischen Frauen (n = 2.193) wurden nach der Geburt fortlaufend rekrutiert und für die endothelialen Stickstoffmonoxidsynthase-Genpolymorphismen G894T genotypisiert.

Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf den mittleren arteriellen Blutdruck, die Eiweißausscheidung im Urin oder neu aufgetretene periphere Ödeme zwischen den verschiedenen Genotypen der Schwangeren. Die funktionale Relevanz der NOS3-Varianten allein scheint nicht stark genug zu sein, um die Blutdruckregulation während der Schwangerschaft zu beeinflussen. Ethnizität spielt eine wichtige Rolle in genetischen Assoziationsstudien. Unsere Ergebnisse stimmen mit allen Fall-Kontroll-Studien überein, die mit dem G894T-Polymorphismus in kaukasischen Bevölkerungsgruppen durchgeführt wurden.

## Abstract

Hypertensive disorders of pregnancy contribute significantly to maternal and neonatal morbidity and mortality. They are multifactorial traits resulting from interactions between a variety of genetic and environmental factors. Nitric oxide (NO) synthase activity has been reported to be increased in various maternal tissues during normal pregnancy. Long-term NO synthase inhibition produces a pre-eclampsia-like syndrome. Polymorphisms of the endothelial NO synthase gene (NOS3), which impair NO availability, have been suspected to contribute to increased predisposition to hypertensive disorders of pregnancy.

NO produced by endothelial NO synthase inhibits platelet activation and represents a crucial modulator for the maintenance of maternal systemic vasodilatation and reduced vascular reactivity seen during normal pregnancy. A reduction of placental endothelial NO synthase activity has been demonstrated in pre-eclampsia. Locally generated NO might be needed to promote cytotrophoblast endovascular invasion, which is impaired in pre-eclampsia. The common NOS3 G894T exon 7 variant (rs1799983) is associated with reduced basal NO production. This genetic association study was conducted to assess whether genetically determined alterations of the nitric oxide system are associated with clinical markers of pre-eclampsia.

A large number of Caucasian women (n = 2.193) were consecutively included after delivery and genotyped for the endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms G894T. There are no significant differences in mean blood pressure, protein excretion or new-onset peripheral oedema between any of the genotypes over the course of pregnancy. The functional relevance of the NOS3 variants alone does not seem to be strong enough to affect blood pressure regulation during pregnancy. Ethnicity plays an important role in genetic association studies. Our results are in line with all case-control studies done on the G894T polymorphism in Caucasian populations.

# 1. Einleitung

## 1.1. Endotheliale NO-Synthase

### 1.1.1. Die Entdeckung von Stickstoffmonoxid

Obwohl Ferid Murad schon in den späten 1970er Jahren zeigte, daß Stickstoffmonoxid (NO) als aktivierender Ligand der Guanylatcyclase eine Gefäßmuskelrelaxation bewirkt, war nicht klar, dass NO auch ein endogener Vasorelaxant ist. Erst später wurde klar, dass Acetylcholin am intakten Gefäß einen indirekten vasodilatierenden Effekt hat, welcher über das Endothel durch den Endothelium-Derived-Relaxing Faktor (EDRF) vermittelt wird. 1986 stellten Furchgott und Ignarro fest, dass NO und EDRF in vergleichbarer Weise glatte Gefäßmuskulatur relaxieren und von Hämoglobin und Superoxiden inaktiviert werden. Sie nahmen an, dass EDRF Stickstoffmonoxid ist, oder zumindest eine labile Verbindung, welche NO freigibt. Inzwischen ist bewiesen, dass die aktive Form von EDRF das kleine, labile, anorganische Molekül Stickstoffmonoxid ist. 1998 wurden die drei Forscher für ihre Entdeckung mit dem Nobelpreis für Medizin ausgezeichnet [1-3].

NO ist ein freies Radikal, das in Gasform äußerst reaktiv und instabil ist. In Gegenwart von Sauerstoff wird es innerhalb von Sekunden durch Konversion zu Nitrit und/oder Nitrat inaktiviert. Die kurze Halbwertszeit begrenzt sein biologisches Handeln auf die Generatorzelle selbst oder auf Zellen in der näheren Umgebung [4]. Es ist lipophil, diffundiert leicht über biologische Membranen und dient als wichtiger intrazellulärer Mediator im vaskulären System, in der Niere, im endokrinen System und im zentralen Nervensystem. Folglich trägt NO zu den komplexen Regulationen des lokalen und systemischen Gefäßwiderstandes bei und nimmt an der Verteilung des Blutflusses und der Sauerstoffbereitstellung, der Salzhomöostase und der Regulation des arteriellen Blutdrucks teil. Exzessive NO-Synthese kann in systemischer Blutdrucksenkung enden, was besonders bei der Pathogenese des septischen Schocks von Bedeutung ist. Auf der anderen Seite kann eine beeinträchtigte NO-Synthese zu einer pathologischen Vasokonstriktion mit Bluthochdruck bzw. Gewebeischämie führen [3,5]. Die Effekte von NO können durch Methylenblau gehemmt werden [6].

Der Ausgangsstoff der Biosynthese von NO war schon bekannt, bevor NO als endogener Wirkstoff des Immunsystems identifiziert wurde. 1978 wurde gezeigt, dass die Aminosäure L-Arginin die zytotoxische Wirkung aktivierter Makrophagen in Mäusen steigert. Auch die Endprodukte L-Citrullin, Nitrit und Nitrat sind im Zusammenhang mit der aktivierten Immunabwehr schon frühzeitig beschrieben worden. Erst später wurde gezeigt, dass NO und Citrullin die Reaktionsprodukte der Oxidation von L-Arginin sind. Heute ist erwiesen, dass NO infolge einer fünffachen Elektronenübertragung aus L-Arginin entsteht, bei der 1,5 NADPH-Äquivalente und zwei Sauerstoffmoleküle verbraucht werden. Katalysiert wird diese Reaktion durch das Enzym Stickstoffmonoxid-Synthase (NOS) [7-10].

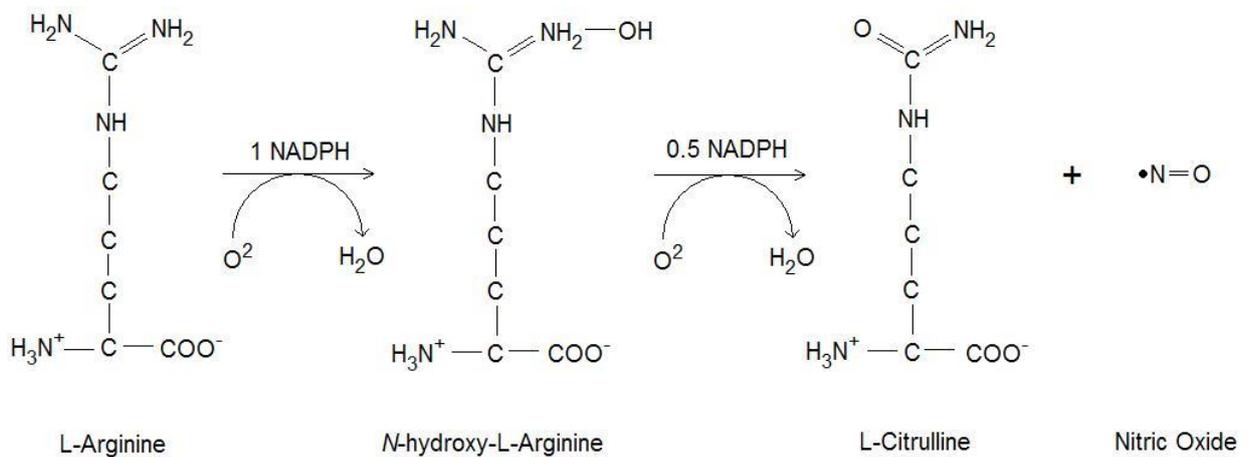


Abbildung 1. Biosynthese von Stickstoffmonoxid (Quelle: Stuehr, D.J. 2004. Enzymes of the L-arginine to nitric oxide pathway. Journal of Nutrition. 134:2748-2751)

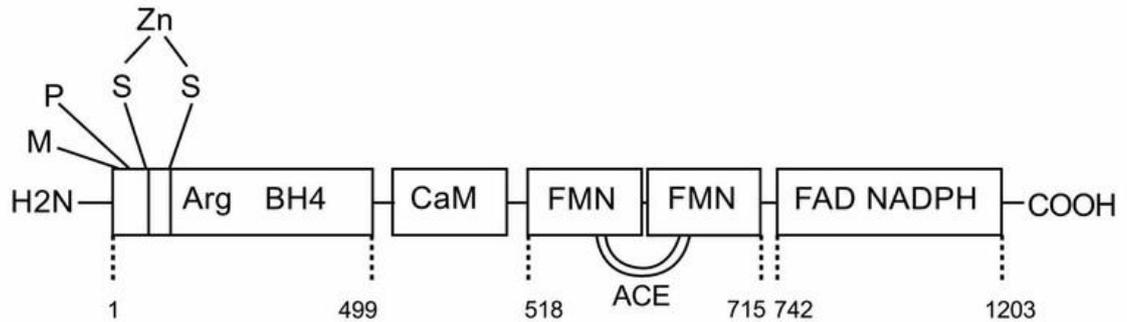
### 1.1.2. Die NO-Synthase

1990 wurde erstmals von Bredt und Snyder eine NADPH- und L-Arginin-abhängige NO-Synthase (NOS) aus Homogenaten von Rattenhirnen isoliert. Schnell etablierte sich die These, dass für die Synthese von NO in Säugetieren mehrere NOS-Isoformen existieren [2,5].

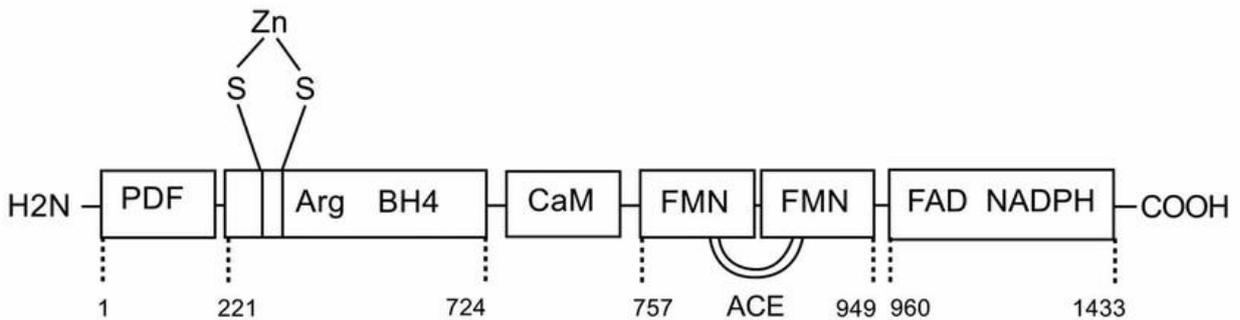
Inzwischen sind drei Unterformen der NO-Synthase bekannt: neben der neuronalen NOS existieren die endotheliale und die induzierbare NOS. Die Sequenzen der einzelnen Isoformen sind durch die Arten hinweg zu 80-94 % identisch, doch die Gesamtheit der Sequenzidentität

zwischen den verschiedenen Isoformen liegt nur bei 50-60%. Die Sequenzidentität der Isoformen ist hauptsächlich durch die Homologie der Kofaktorbindungsstellen bedingt. Diese Kofaktorbindungsstellen bestehen aus Flavin-Adenin-Dinukleotid (FAD), aus Flavin-Adenin-Mononukleotid (FAM), aus Eisen-Protoporphyrin IX (Häm) und aus Tetrahydrobiopterin (BH4) [2,11].

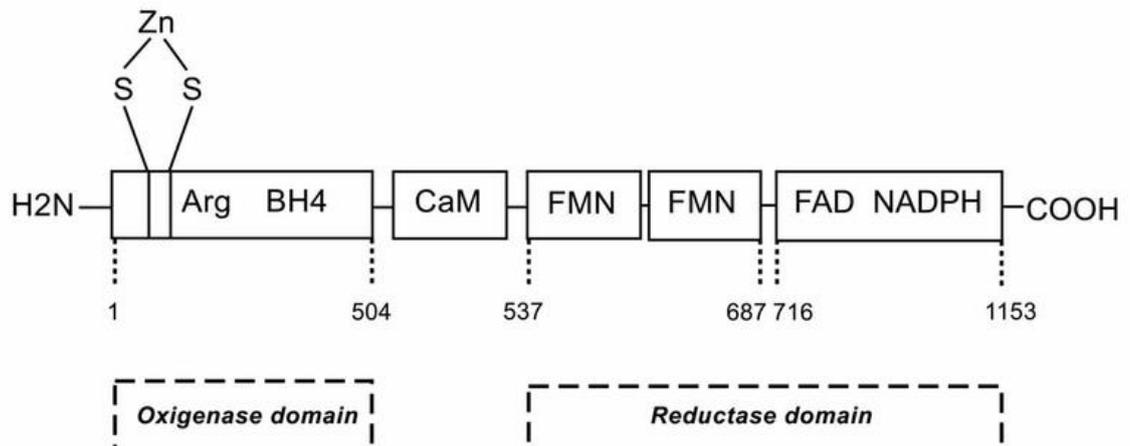
### Human Endothelial NOS



### Human Neuronal NOS



### Human Inducible NOS



*Abbildung 2. Schematischer Aufbau der eNOS, nNOS und iNOS mit Oxygenase- und Reduktasedomänen: Bindungsregion für Calmodulin (CaM), Flavinmononukleotid (FMN), Flavinadeninukleotid (FAD) und NADPH in der Reduktasedomäne, und Häm, Tetrahydrobiopterin (BH4) und L-Arginin in der Oxygenasedomäne (Quelle: Modifiziert durch Rojas, A. von Alderton, R.K., Cooper, C.E. and Knowles, R.G. Nitric oxide synthases: structure, function an inhibition. Biochem. J. 2001; 357:593-615)*

Der weitere Aufbau der NO-Synthase ist folgendermaßen gestaltet: sie besitzt ein C-terminales Ende, welches mit der Cytochrom P450 Reduktase nahezu identisch ist. Wie bei dieser werden die Flavine benutzt, um Elektronen von dem Elektronendonator NADPH an Häm abzugeben. Der Häm-bindende Teil der NOS ist ihr N-terminales Ende. Folglich bestehen alle drei Isoformen aus einer reduzierenden C-terminalen Domäne und einer oxidierenden N-terminalen Domäne. Die Reduktasedomäne besteht aus FAD sowie FMN und bindet NADPH. Sie fungiert so als Elektronenspeicher und -transporter. Die Oxidasedomäne besteht aus Häm und bindet das Substrat L-Arginin, welches am Ende der Reaktion NO und L-Citrullin freigibt. Die Funktion von BH4, einem Redox-Kofaktor aromatischer Aminosäurehydroxylasen, ist nicht ganz klar. Auf jeden Fall scheint BH4 für die beiden Monooxygenase-Schritte der NOS notwendig zu sein [11].

Getrennt werden die Reduktase- und die Oxidasedomäne durch die calmodulinbindende Sequenz. Auf der Basis von Untersuchungen über den Elektronenaustausch der Reaktion wird eine Scharnertätigkeit dieser Region zwischen dem C-terminalen und dem N-terminalen Ende angenommen. Wenn Kalzium/Calmodulin nicht gebunden ist, ist die Reduktase nicht darauf ausgerichtet, Elektronen an Häm zu liefern. Nur wenn Kalzium/Calmodulin gebunden ist, ist die Reduktase aktiv, d. h. Elektronen werden von den reduzierten Flavinen zu Häm transferiert und so die Synthese von NO induziert [2,11].

Dieser Mechanismus trifft in unterschiedlicher Weise auf die Isoenzyme der NOS zu: die Aktivität von nNOS und eNOS ist bei ansteigenden Kalziumspiegeln erhöht. Sie werden als konsekutive Enzymformen bezeichnet. Bei ihnen ist Calmodulin erst nach Übersteigerung einer Schwellenkonzentration für intrazelluläres Kalzium gebunden. Dann produziert die aktive Enzymkonformation für wenige Minuten NO, sogenannte physiologische „Puffs“ [12]. Die induzierbare NO-Synthase iNOS hat ausreichende Affinität zu Calmodulin, so dass sie auch bei einem sehr niedrigen Kalziumspiegel gebunden bleibt [11]. Dadurch sind die Domänen der

iNOS stets ausgerichtet Elektronen zu liefern und somit immer bereit zu voller katalytischer Aktivität. Einmal induziert kann sie kontinuierlich über Stunden bis Tage NO produzieren. Induziert wird sie in allen bisher untersuchten Säugetierzellen durch immunologische Stimuli [13].

Die große Menge an NO, die potentiell zum Untergang von Gewebe führen kann, wird von der iNOS produziert, weniger von den andern beiden Isoformen. Nichtsdestotrotz gibt es Situationen, wie z. B. beim ischämischen Hirnschaden, in denen ein langanhaltender hoher Kalziumspiegel die Isoformen eNOS und nNOS zur Produktion von toxischen Mengen NO aktivieren kann [11].

### 1.1.3. Eigenschaften der endothelialen NOS (eNOS)

#### Zelluläre Expression

Die endotheliale NO-Synthase erzeugt NO in Endothelzellen und in Thrombozyten. Obwohl in den meisten Organen eine Aktivität dieser Isoform gefunden wird, ist dies im Allgemeinen auf die endothelialen Zellen des vaskulären Systems dieser Organe zurückzuführen. Ebenfalls wurde eNOS in Tubulusepithelzellen der Niere, in Synzytotrophoblasten der humanen Plazenta und in CA1-Neuronen identifiziert [2,14, 15].

Im vaskulären System hat sie entscheidenden Anteil an der Regulation der Gefäßspannung, an der Inhibition der Thrombozytenaggregation und am Schutz vor einer Leukozytenadhäsion [16]. Auch wenn es zusätzlich einige aus dem Endothel stammende Vasodilatoren und vasokonstriktische Substanzen wie Endothelin-1, Prostacyclin (PGI<sub>2</sub>), Prostaglandin H<sub>2</sub>, das Superoxidanion (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) und den Endothelium-derivid Hyperpolarisation Factor (EDHF) gibt, spielt keine dieser Substanzen eine solch zentrale Rolle bei der lokalen Regulation des Gefäßtonus und der Hämostase wie das freie Radikal NO [17,3].

NO übernimmt eine wichtige Aufgabe bei der Thrombozytenaggregationshemmung. Durch Aktivierung der Guanylatzyklase, Hemmung der Phosphinositid-3-Kinase, Verhinderung des Kalziumeinstroms und Hemmung der Cyclooxygenase-1 limitiert endotheliales NO die Thrombozytenaktivierung, -adhäsion und -aggregation [18]. NO wirkt somit antithrombotisch und dient der Aufrechterhaltung des lokalen Blutflusses [3,18].

In Versuchen mit eNOS-Knockoutmäusen korrelieren Veränderungen in der endothelialen Funktion, wie sie bei kardiovaskulären Erkrankungen auftreten, mit der Erzeugung von NO [19]. So ist die Niere außerordentlich sensibel gegenüber NO. Eine Inhibierung der NO-Produktion resultiert in einer Erhöhung der Salz- und Wasserretention und nachfolgend in einer Steigerung des Blutdrucks [20]. Die endothel-abhängige Dilatation ist bei Menschen mit Hypercholesterinämie geringer als bei solchen mit normalen Cholesterinwerten [21]. Bei der Entwicklung von Arteriosklerose spielt NO folgende Rolle: NO wirkt als Antioxidant bei der Vorbeugung von oxidativen Verletzungen am Endothel und schwächt die subintimale LDL-Oxidation ab. NO vermag außerdem die Chemotaxis und Adhäsion von Monozyten und Leukozyten an endotheliale Oberflächen zu kontrollieren und die Proliferation von glatter Gefäßmuskulatur zu regulieren [22].

### Regulation der Expression

Die eNOS-Expression wird durch die Wirkung von Scherkräften (*shear stress*) an der Gefäßwand, hervorgerufen durch intraluminalen Fluss, erhöht. Ebenso durch körperliche Belastung [23] und Exposition gegenüber einer Reihe von Antioxidantien und Östrogenen [24]. Einige potentielle pathophysiologische Faktoren erniedrigen sie, so z. B. der Tumornekrosefaktor- $\alpha$ . Der Mechanismus läuft dabei höchstwahrscheinlich über eine Verkürzung der Halbwertszeit der eNOS-mRNA [19].

Hypoxie als Regulationselement der eNOS wird kontrovers diskutiert. In arteriellen Endothelzellen der humanen Lunge reduziert Hypoxie die eNOS-mRNA. Ebenso wird eine Reduktion der eNOS-Expression in venösen Endothelzellen des Menschen und in bovinen Aortenendothelzellen in Gegenwart von Hypoxie demonstriert. In zerebralen Blutgefäßen wird jedoch eine Hochregulierung der eNOS bei zerebraler Ischämie beschrieben. Ebenso stimulierte Hypoxie die NO-Freisetzung am Herzen [14].

Eine Vielzahl von Proteinkinasen, mit eingeschlossen die cAMP-aktivierte Proteinkinase und die Proteinkinase C, aktivieren die Produktion von NO aus Arginin durch Modulation der eNOS mit einem Phosphorylierungsprozess [25].

Bei der allosterischen Regulation der eNOS-Aktivität durch den Calmodulin/Kalzium-Komplex ist wieder besonders die Wirkung von *shear stress* ausschlaggebend. Eine Reihe von Transmittern, wie z.B. Acetylcholin, Histamin und Bradykinin, relaxieren die glatte Gefäßmuskulatur nach der Interaktion mit M3-, H1- oder B2-Rezeptoren, was zur Aktivierung einer Phospholipase C $\beta$  und nachfolgender Hydrolyse von Phosphatidylinosit-4,5-bisphosphat

führt. Das entstehende Inosit-1,4,5-trisphosphat setzt Kalzium aus intrazellulären Speichern frei [25].

### Chromosomale Lokalisation und genomische Struktur

Die humane eNOS-mRNA wird durch 26 Exons kodiert, die 21-22 kb DNA umfassen. Das Gen ist in der 7q35-7q36 Region des Chromosom 7 lokalisiert [26].

#### 1.1.4. Der eNOS-Polymorphismus

An Position 894 auf dem Exon 7 steht in der Originalsequenz des eNOS-Gens (NOS3) die Nukleinsäure Guanin. Es besteht jedoch die Möglichkeit, dass an dieser Stelle Guanin (G) durch Thymidin (T) ersetzt ist. Dies führt auf dem Codon 298 des eNOS-Proteins zu einer Änderung der Aminosäuresequenz: Glutamat (Glu) wird durch Aspartat (Asp) ersetzt. Es wird deshalb von einem NOS3-G894T-Polymorphismus bzw. Glu298Asp-Polymorphismus der endothelialen NO-Synthase gesprochen.

Es wurde gezeigt, dass dieser Polymorphismus positiv mit arteriellem Hypertonus korreliert [27-30]. Auch wurde bestätigt, dass die eNOS-Glu298Asp Variante mit reduzierter basaler NO-Produktion assoziiert ist. Deshalb, so wird angenommen, kann dieser Polymorphismus eine Rolle bei der NO-assozierten Entstehung von Artherosklerose und Hypertension spielen [31].

In einer japanischen Studie wurde diese Missense-Variante signifikant häufiger bei Patientinnen mit bedrohlicher Präeklampsie gefunden [32]. Demselben Genpolymorphismus zugrundegelegt wird die frühzeitige Plazentaablösung [33].

Da die Präeklampsie einen unabhängiger Risikofaktor bei der Entwicklung von kardiovaskulären Erkrankungen darstellt, ist die Rolle der Missense-Variante bei unterschiedlichen Erkrankungen als durchaus interessant anzusehen [34].

#### 1.1.5. Zelluläre Mechnismen von NO

### Hämproteine

In niedrigen Konzentrationen reagiert NO mit Fe<sup>2+</sup>-Hämproteinen, um viele seiner biologischen Aktivitäten zu entwickeln. Für die Guanylatzyklase und die Cyclooxygenase führen die Interaktionen mit NO zu einer Steigerung ihrer enzymatischen Aktivität. Auf der anderen Seite hemmt NO andere Hämproteine, welche eine Rolle bei der Synthese von bioaktiven Mediatoren oder der Signaltransduktion spielen, z.B. Cytochrome P450, Lipoxygenasen, Thromboxan-Synthase, Katalase und Peroxidase [11].

### Guanylatzyklase

Die Häm-Gruppe der löslichen Form der Guanylatzyklase ist eine der sensibelsten und wichtigsten Stellen der NO-Aktivität, was an der wichtigen Rolle von cGMP bei vielen NO-vermittelten Antworten liegt [11]. Im Falle einer Bindung von NO an Häm-Fe<sup>2+</sup> der Guanylatzyklase ändert sich die Konformation der Häm-Untereinheit des Enzyms, was schließlich seine Aktivität und die Produktion von zyklischem GMP aus GTP bedingt [35]. Diese wiederum aktiviert die Proteinkinase G, die nachfolgend die leichten Ketten des Myosins dephosphoriliert und eine Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen bewirkt [3]. In Thrombozyten wirkt NO ebenfalls hauptsächlich über cGMP und eine dadurch bedingte Senkung des intrazellulären Kalziumspiegels. Eine Erhöhung der Kalzium-Ionenkonzentration ist das zelluläre Hauptsignal für Formwandel, Adhäsion sowie Aggregation von Thrombozyten.

### Thiol-besitzende Proteine

Wichtige zelluläre Ziele von NO sind Sulfhydryl (SH)-Proteine. NO-Derivate interagieren mit diesen SH-Gruppen und produzieren biologisch aktive S-Nitrosothiole. Diese wirken wie NO über Signaltransduktionsprozesse, Rezeptoren und G-Proteine. Sie sind potente Vasodilatoren und inhibieren die Plättchenaggregation. Die Halbwertszeit dieser Verbindungen ist jedoch signifikant länger als die von NO [4]. Unklar ist, was die ADP-Ribosylierung zur NO-vermittelten Modulation der Proteinfunktion beiträgt [11].

### Rezeptoren

NO wirkt am N-Methyl-D-Aspartat (NMDA)-Rezeptor an Synapsen. Teil des Mechanismus ist die Öffnung des Ionenkanals durch Glutamat, der darauffolgende Kalziumionen-Einstrom und die Aktivierung der NO-Synthase über Calmodulin. Das so gebildete NO kann nun aus seiner

Generatorzelle in benachbarte Effektorzellen, z.B. Gliazellen, präsynaptische Nervenendigungen oder glatte Muskelzellen, diffundieren und die zytosolische Guanylatzyklase aktivieren [1,3,11].

### Signalsystem

Für die Immunabwehr ist die Interaktion von NO mit nicht an Häm gebundenem Fe<sup>2+</sup> von Bedeutung. NADPH besitzt Fe<sup>2+</sup> als essentiellen Kofaktor und lässt sich von NO hemmen [4]. Dies führt in neutrophilen Granulozyten zur Freisetzung von Superoxid [11] und hemmt die mitochondriale Atmungskette in Mikroben [16]. Vermutlich kann NO die Aktivität von diversen Proteinen über Änderungen des Phosphorylierungszustandes beeinflussen, so wird z. B. die Proteinkinase C von NO gehemmt. Angeregt wird die Phosphorylierung durch direkte Interaktion von NO mit G-Proteinen [11]. Außerdem kann NO die Relaxation glatter Muskulatur beeinflussen. Die Aktivierung von kalziumabhängigen Kaliumkanälen führt in glatter Muskulatur zu Hyperpolarisation. Die nachfolgende Inaktivierung der spannungsabhängigen Kalziumkanäle verursacht eine Senkung der Kalziumkonzentration, was wiederum die Relaxation der glatten Muskulatur fördert [11,35].

### Transkription

NO kontrolliert die Expression von Genen, die für bestimmte vasoaktive Substanzen kodieren. In Endothelzellkulturen wird eine Herunterregulierung des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 und des von Thrombozyten sezernierten *Plated Derived Growth Faktor* (PDGF) eine wichtige Rolle bei der Hämostase zugeschrieben [4].

## 1.2. Allgemeines zu NO und Schwangerschaft

### 1.2.1. Maternale systemische Zirkulation

In einer normalen Schwangerschaft kommt es zu einer Vasodilatation der maternalen systemischen Zirkulation. Kardialer Auswurf, renaler Blutfluss und glomeruläre Filtrationsrate (GFR) steigen um 30-60 % an [36-39]. Viele Studien haben demonstriert, dass NO eine zentrale Rolle bei der systemischen Hämodynamik und renalen Vasodilatation der Schwangeren spielt

[40,41-45]. Weiterhin wurde eine erhöhte NO-Produktion in einer normalen Schwangerschaft gezeigt [40,41]. Bei der schwangeren Ratte steigen Plasma- und Urinspiegel von cGMP an, einem second messenger von NO. Ebenfalls steigen die Spiegel von Nitrat und Nitrit. Sie sind Metabolite von NO und Indikatoren der Gesamtkörper-NO-Produktion [41-43]. Chronische Verabreichung von NOS-Inhibitoren an schwangere Ratten führt zu einem merklichen Anstieg des arteriellen Drucks, einer reduzierten GFR, zu Proteinurie, Thrombozytopenie und einem reduzierten Plasmavolumen und Neugeborenenengewicht. Alles Abnormalitäten, die an Präeklampsie denken lassen [46-49]. Diese Effekte, ausgelöst durch eine NO-Blockade, sind durch die Gabe von L-Arginin reversibel [50,51]. In Gefäßen, isoliert von präeklampsischen Schwangeren, wurde von verschlechterten Endothel-abhängigen Reaktionen berichtet [52-54].

### 1.2.2. Uteroplazentarer Blutfluss

Es gibt viele Anzeichen, die darauf schließen lassen, dass es eine Beziehung zwischen dem Anstieg der NO-Produktion und dem Anstieg des uteroplazentaren Blutflusses während der Schwangerschaft gibt [55]. Die Aktivität der eNOS ist während der Schwangerschaft im Endothel der uterinen Arterie erhöht, während im systemischen Endothelium dies nicht der Fall zu sein scheint [56,57]. Eine chronische Reduktion des uterinen Perfusionsdrucks in der schwangeren Ratte führt ebenfalls zu Präeklampsie-ähnlichen Ereignissen [58]. Gleichzeitig ist die Aktivität des Endothel-abhängigen NO-cGMP-Signalweges reduziert [59].

### 1.2.3. Plazenta, Nabelschnur und Myometrium

eNOS-Aktivität wird vor allem in den Synzytiotrophoblasten gefunden. Möglicherweise inhibiert das von Synzytiotrophoblasten gewonnene NO die Aggregation von Thrombozyten im intervillösen Raum, trägt zur Vasodilatation der fetoplazentaren Arteriolen bei, reguliert Transportprozesse und Hormonproduktion der Synzytiotrophoblasten und moduliert die Immunfunktion. Immunhistochemisch nachgewiesen wird eNOS in der umbilikalen Arterie und Vene [55]. Der niedrige vaskuläre Widerstand der fetoplazentaren Zirkulation wird anhand von Versuchen mit NOS-Inhibitoren durch eine basale Produktion von NO erklärt [60-62].

NO relaxiert das Myometrium in vitro und, wenn auch in geringerem Maße, ebenfalls in vivo. Das Myometrium von Schwangeren scheint weniger sensitiv gegenüber den relaxierenden

Effekten von NO zu sein [55]. Zum Ende der Schwangerschaft hin sinkt die NOS-Aktivität [63]. Immunhistochemisch wird die eNOS in endometrialen Stromazellen und im Gefäßendothelium gefunden [64]. Eine Einleitung der Geburt durch NOS-Inhibitoren wird jedoch nicht beobachtet [55].

### 1.3. Arterieller Hypertonus in der Schwangerschaft

#### 1.3.1. Physiologische Blutdruckregulation in der Schwangerschaft

In der Schwangerschaft kommt es physiologisch zu einer Zunahme des Herzminutenvolumens um 30-60 %, hauptsächlich durch eine Zunahme des Herzschlagvolumens.

Das zirkulierende Blutvolumen steigt ebenfalls um bis zu 50 % an. Dies wird mit einer erhöhten Aktivität des Renin-Angiotensin-Aldosteron-Systems erklärt. Der systolische und vor allem der diastolische Blutdruck beginnen bereits im 1. Trimenon zu sinken und erreichen im 2. Trimenon Tiefstwerte. Gegen Ende des 3. Trimenons steigen sie wieder auf die Ausgangswerte an [65].

Der arterielle Blutdruck wird bestimmt durch das Herzminutenvolumen und den peripheren Gefäßwiderstand. Demzufolge muss den sinkenden Blutdruckwerten ein verminderter peripherer Gefäßwiderstand zugrunde liegen.

Als wichtiger Vasodilatator gilt der in der Schwangerschaft vermehrt produzierte potente endotheliale Vasodilatator NO. Er spielt für die Adaptation des Kreislaufsystems in der Schwangerschaft eine entscheidende Rolle [66].

#### 1.3.2. Pathologische Blutdruckregulation in der Schwangerschaft

Der arterielle Hypertonus ist die häufigste Komplikation in der Schwangerschaft und ist definiert als ein Blutdruck von systolisch  $> 140$  mmHg und diastolisch  $> 90$  mmHg oder ein Blutdruckanstieg von systolisch  $> 30$  mmHg und diastolisch  $> 15$  mmHg gegenüber der nicht schwangeren Frau. Erhöhte Blutdruckwerte finden sich bei 5-10 % aller Schwangeren. Die Erkrankung zeigt eine bimodale Verteilung und tritt häufiger bei jungen Frauen in ihrer ersten Schwangerschaft und bei älteren Multipara auf. Ein Anstieg der Blutdrucks in der Schwangerschaft indiziert annähernd immer die Gegenwart von einer der vier Konditionen: (1)

Präeklampsie, (2) Pfropfpräeklampsie, (3) chronische essentielle Hypertonie oder (4) transiente Hypertonie

Nach Definition der WHO gilt ein systolischer Blutdruck von mehr als 140 mmHg und/oder ein diastolischer Blutdruck von mehr als 90 mmHg als arterielle Hypertonie. Diese Grenzwerte wurden festgelegt, da epidemiologische Evidenz vorliegt, dass Nichtschwangere als Folge von höheren Blutdruckwerten ein erhöhtes Risiko für kardiovaskuläre Erkrankungen haben. Für den Schwangerschaftshypertonus ist dies jedoch zunächst nicht relevant, da der Bluthochdruck nach der Beendigung der Schwangerschaft meist nicht fortbesteht. Das relevante Kriterium ist, welcher Blutdruck gefährdend für das ungeborene Kind bzw. die Mutter sein kann. Studien mit insgesamt mehr als 30.000 untersuchten Schwangerschaften demonstrierten, dass ein diastolischer Blutdruck über 80 mmHg und mittlerer arterieller Blutdruck über 90 mmHg zu jedem Zeitpunkt der Schwangerschaft mit einer erhöhten kindlichen Sterblichkeit einhergeht [67].

Eine andere Studie mit 15.000 schwangeren Frauen zeigte, dass mit jedem Anstieg des mütterlichen Blutdrucks um 5 mmHg die perinatale Mortalität stufenweise ansteigt. Bei einem mütterlichen diastolischen Druck von mehr als 90 mmHg während des dritten Trimenon war das Risiko einer Totgeburt, einer fetalen Wachstumsretardierung und der Entwicklung einer Präeklampsie erhöht [68].

Dies verdeutlicht, wie unbedeutend die sonst übliche Definition des Bluthochdrucks bei der Schwangeren sind.

### Präeklampsie

Als Präeklampsie wird die Verbindung einer arteriellen Hypertonie mit einer Proteinurie bezeichnet, die nach der 20. Schwangerschaftswoche auftritt. Eine signifikante Proteinurie liegt bei einem Eiweißverlust von mehr als 300 mg in 24 Stunden vor. Dies entspricht einer Anzeige von 1-2 Kreuzen auf einem semiquantitativen Urineststreifen. Bei fehlender Proteinurie sollte eine Präeklampsie mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden, wenn die Hypertonie mit systemischen Symptomen wie Kopfschmerzen, Sehstörungen, Hyperreflexie, Oberbauchschmerzen, Leberenzymerrhöhung oder Thrombozytopenie einhergeht.

Wichtig ist, und das unterscheidet die Präeklampsie von der chronischen bzw. der transienten Hypertonie während der Schwangerschaft, dass es sich um eine systemische Erkrankung handelt und dass einige ihrer nicht-hypertensiven Komplikationen lebensbedrohlich sein können, auch wenn die Blutdruckerhöhung nur sehr gering ausgeprägt ist.

Folgende diagnostische Befunde machen eine Präeklampsie wahrscheinlich:

- RR systolisch > 160 mmHg oder diastolisch > 110 mmHg
- Proteinurie > 2 g/24 h (2+ oder 3+ im Urinteststreifen) erstmals auftretend
- Serumkreatinin erstmals > 1,2 mg/dl
- Thrombozyten < 100.000 Gpt/l bzw. Hinweise für eine mikroangiopathische Anämie (mit erhöhter Laktatdehydrogenase)
- Erhöhte hepatische Enzymaktivität
- Persistierender Kopfschmerzen, zerebrale oder visuelle Störungen
- Persistierende epigastrische Schmerzen

Die Präeklampsie ist also eine schwangerschaftsinduzierte Multiorganerkrankung, die in vielen Ländern an erster Stelle der mütterlichen Todesursachen steht und für 20-25 % der perinatalen Mortalität verantwortlich ist.

Es handelt sich um ein Syndrom, welches zu maternalen und fetalen Manifestationen führt. Die maternale Erkrankung ist charakterisiert durch einen Vasospasmus der Widerstandsgefäße, eine Aktivierung des koagulatorischen Systems und eine Störungen der Kontrolle von Volumen und Blutdruck. Oxidativer Stress und eine entzündungsähnliche Reaktion könnten bei der Pathophysiologie ebenfalls von Bedeutung sein. Die pathologischen Veränderungen dieser Erkrankung sind hauptsächlich ischämischer Natur und betreffen die Gefäße nahezu aller Organsysteme der Mutter. Die Schädigungen von Plazenta, Nieren, Leber und Gehirn treten dabei besonders hervor. Die klassischen Syndrombestandteile Bluthochdruck und Proteinurie spiegeln die Beteiligung der Widerstandsgefäße und der glomerulären Gefäßbezirke wider [69-72].

Die Ätiologie der Präeklampsie ist nach wie vor relativ unbekannt. Da die Beendigung der Schwangerschaft die einzige definitive Heilung der Präeklampsie ist, sehen viele die Plazenta als pathophysiologischen Fokus der Erkrankung.

Das geläufige Modell beschreibt zwei charakteristische pathophysiologische Veränderungen bei der Präeklampsie. Die Trophoblasteninvasion der uterinen Spiralarterien bei Müttern mit Präeklampsie scheint gestört zu sein. Dadurch kommt es im Laufe der Schwangerschaft zu einer verminderten plazentaren Perfusion, was letztendlich zu einer Hypoxie der Plazenta führt.

Gleichzeitig liegt eine diffuse endotheliale Dysfunktion vor, die eventuell sogar die Ursache der gestörten Plazentation sein könnte [69-72].

Die Präeklampsie ist mit einer erhöhten Synthese der vasokonstriktorischen Substanzen Thromboxan und Endothelin und einer erniedrigten Synthese der Vasodilatoren Prostazyklin und NO assoziiert. NO spielt normalerweise eine Rolle bei der Regulation des Gefäßwiderstandes. Bei Frauen mit Präeklampsie wurde in umbilikalischen Gefäßen eine herabgesetzte Synthese von NO nach der Gabe von Bradykinin gefunden [73].

Auch die strömungsvermittelte Vasodilatation kleiner Gefäße präeklampsischer Frauen war gestört [74].

Durch die Inhibierung der NO-Synthese bei schwangeren Tieren wurden hämodynamische Veränderungen ähnlich die der Präeklampsie hervorgerufen [75].

In der normalen Schwangerschaft wird die Verminderung des peripheren Widerstandes von einer zunehmenden Resistenz der Gefäße gegenüber vasokonstriktorisch wirkenden Substanzen begleitet [76].

Beim Infundieren einer vasokonstriktorischen Substanz zeigten sich im ersten Trimenon keine signifikanten Unterschiede zwischen normal verlaufenden und präeklampsischen Schwangerschaften. Die infundierte Menge, bei der es zu einer Blutdruckerhöhung um 20 mmHg kam, reduzierte sich jedoch bei den Patientinnen im Verlauf der Schwangerschaft. Das geschah lange bevor die Erkrankung in Erscheinung trat. Die arterielle Hypertension bei der Präeklampsie scheint demnach nur eine verspätete Manifestation einer vaskulären Veränderung und nicht verantwortlich für die multiplen Dysfunktionen zu sein.

Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die veränderte vaskuläre Reaktivität bei der Präeklampsie auf einer Störung der Endothel-abhängigen Relaxationsfähigkeit der Gefäße beruht. Manifestationen einer endothelialen Dysfunktion sind systemische Vasokonstriktion und Koagulopathie [77-80].

Was genau jedoch die Störung der Endothel-abhängigen Relaxationsfähigkeit der Gefäße bedingt ist unklar.

Die gefährlichste Komplikation der Präeklampsie ist die Eklampsie, definiert als generalisierte tonisch-klonische Krämpfe, die vor, während oder nach der Geburt auftreten können.

Risikofaktoren für eine Präeklampsie sind eine präexistierende arterielle Hypertension, Nierenerkrankungen, Übergewicht, eine bereits existierende Thrombophilie, eine Präeklampsie in der Eigen- bzw. Familienanamnese, ein außergewöhnlich hohes bzw. niedriges Alter der

Mutter und ein Vater, der bereits Zeugungspartner einer präeklampsischen Schwangeren war. Bei Risikopatientinnen ist die Inzidenz gegenüber dem Normalkollektiv um 20-25 % erhöht, jedoch stellen sie insgesamt nur 14 % aller Krankheitsfälle dar. Weitaus häufiger erkranken Erstgebärende, die diesem Risikoprofil nicht entsprechen [81,82].

### Pfropfpräeklampsie

Tritt zu einer bereits bestehenden arteriellen Hypertonie eine neu aufgetretene oder sich verschlechternde Proteinurie hinzu oder zeigen sich klinische und laborchemische Merkmale einer Präeklampsie, so spricht man von einer Pfropfpräeklampsie [83].

### Essentielle Hypertonie

Die chronische bzw. vorbestehende Hypertonie ist definiert durch erhöhte Blutdruckwerte in der ersten Schwangerschaftshälfte oder, bei erstmaliger Diagnose in der Schwangerschaft, durch das Persistieren der hypertonen Blutdruckwerte > 6 Wochen postpartal. Sie hat in der Mehrzahl der Fälle für den Ausgang der Schwangerschaft keine schwerwiegenden Konsequenzen und liegt bei 1-5 % aller Schwangerschaften vor [83].

Die transiente Hypertonie manifestiert sich erstmals während der Schwangerschaft. Hinter ihr verbirgt sich meist eine latente essentielle Hypertonie, die durch die Schwangerschaft demaskiert wird. Der Blutdruckanstieg erfolgt nach der ersten Schwangerschaftshälfte und wird nicht von einer Proteinurie begleitet. Bei nachfolgenden Schwangerschaften kommt es meist erneut zu einem Blutdruckanstieg. Die Mutter weist ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung einer essentiellen Hypertonie im späteren Leben auf [83,84].

Während eine schwere essentielle Hypertonie in der Schwangerschaft zur Verhütung von mütterlichen Organschäden behandelt werden muss, wird empfohlen, gering hypertensive Blutdruckwerte in der Schwangerschaft zurückhaltend oder gar nicht zu behandeln. Das Risiko für die Entwicklung einer Pfropfpräeklampsie und der Schwangerschaftsausgang werden durch eine antihypertensive Therapie nicht beeinflusst [84].

### Ödembildung in der Schwangerschaft

Ödeme während der Schwangerschaft werden im Allgemeinen als klinisches Mittel verwendet,

um hypertensive Erkrankungen wie die Präeklampsie zu diagnostizieren. Deshalb wurde der Marker ursprünglich in die Studie aufgenommen. Jedoch sind Ödeme auch bei normalen Schwangerschaften zu beobachten und es scheint, dass es nur einen unbedeutenden Zusammenhang mit der perinatalen Morbidität und Mortalität gibt. In den letzten Jahren wurde dieses klinische Zeichen zur Erkennung der Präeklampsie somit zunehmend verlassen [85].

#### Schwangerschaftshypertonus und der NOS3-G894T-Polymorphismus

Die Assoziation der arteriellen Hypertonie mit dem NOS3-G894T-Polymorphismus ist bekannt [86-88]. Ziel dieser Arbeit ist es, eine Verbindung zwischen hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft und dem G894T-Polymorphismus zu untersuchen. Alle dazu in der Vergangenheit stattgefundenen Untersuchungen waren Fall-Kontroll-Studien und nur bei einer Studie mit japanischen Frauen, die schwere Symptome einer Präeklampsie zeigten, fand sich eine Assoziation mit dem NOS3-Polymorphismus [89]. In vielen anderen Studien konnte die Assoziation nicht bestätigt werden [90-92]. Diese Studie setzt nun Mittelwerte von systolischem und diastolischem Blutdruck sowie der Proteinurie in Beziehung zur Verteilung der NOS3-Genotypen. Sie ist somit in der Lage, eine Veranlagung der Schwangeren zur Entwicklung hypertensiver Erkrankungen in Bezug auf ihren Genotyp zu beschreiben.

## 2. Fragestellung

Ziel dieser Dissertation ist es, den Einfluss des G894T-Polymorphismus des endothelialen NO-Synthase-Gens auf die Blutdruckregulation, die Proteinausscheidung und die Ödembildung in der Schwangerschaft zu untersuchen.

### 3. Studienpopulation und Methodik

#### 3.1. Studiendesign

Bei der vorliegenden Arbeit handelt es sich um eine prospektive Studie. Alle Frauen, die zwischen Januar 2000 und September 2003 an der Charité-Universitätsmedizin Berlin, Campus Mitte entbunden haben, wurden eingeladen, an der Studie teilzunehmen (n = 2.316). 5,3 % der Mütter lehnten die Teilnahme an der Studie ab (verbleibend n = 2.193).

Als Ausschlusskriterien galten Mütter,

- die bei dieser Geburt Mehrlinge zur Welt gebracht hatten
- bei denen ein Hypertonus vor der Schwangerschaft bekannt war bzw. deren mittlerer Blutdruck in der ersten Schwangerschaftshälfte 140 mmHg systolisch bzw. 90 mmHg diastolisch überschritten hatte
- die sich einer antihypertensiven Therapie vor oder während der Schwangerschaft unterzogen hatten

Die Studie wurde der Ethikkommission der Charité vorgelegt und von dieser gebilligt.

Die Methoden umfassen die im folgenden aufgelisteten Schritte in der angegebenen Reihenfolge:

1. Interview der Mutter
2. Erhebung der klinischen Daten des Mutterpasses
3. Laborchemische Analysen mit DNA-Isolierung und Genotypisierung

#### 3.2. Studienteilnehmerinnen

##### 3.2.1. Postpartale Datenerhebung

###### a) Interview

Die Studienteilnehmerinnen gaben ihr Einverständnis zur Aufnahme in die Studie mündlich und beantworteten gleichzeitig folgenden standardisierten Fragebogen:

- Körpergröße der Schwangeren
- Gewicht vor der Schwangerschaft
- Berechneter Entbindungstermin
- Rauchgewohnheiten vor der Schwangerschaft gemessen in gerauchten Packungen pro Tag multipliziert mit den Raucherjahren (Packungsjahre) oder während der Schwangerschaft gemessen an der Anzahl der gerauchten Zigaretten pro Tag
- Vorhandensein einer arteriellen Hypertonie (definiert  $> 140/90$  mmHg) vor der Schwangerschaft
- Antihypertensive Therapie vor bzw. während der Schwangerschaft
- Positive Familienanamnese für arterielle Hypertonie
- Vorhandensein von Fettstoffwechselstörungen
- Therapie einer Fettstoffwechselstörung durch Einnahme eines Lipidsenkers
- Präexistenter Diabetes mellitus
- Ethnischer Hintergrund der Schwangeren

#### b) Mutterpässe

Nach Einverständnigabe der befragten Frauen wurde eine Kopie des jeweiligen Mutterpasses angefertigt.

Wir nahmen folgende Parameter in unsere Datenbank auf:

- **Mütterliche Daten:** Name, Geburtsdatum, Körpergröße, Gravidität, Parität, Körpergewicht vor der Schwangerschaft
- **Serologische Untersuchungen:** Blutgruppe, Rhesusfaktor, Antikörper-Suchtest, Nachweis von HBs-Antigen, Röteln-HAH-Test, Syphilis Suchtest (LSR)
- **Terminbestimmung:** Zykluslänge und -regelmäßigkeit, erster Tag der letzten Regel, Konzeptionstermin, berechneter Entbindungstermin, korrigierter Entbindungstermin
- **Risikofaktoren:** Anamnese und Befunde bei der frauenärztlichen Erstuntersuchung und besondere Befunde im Schwangerschaftsverlauf, die zu einer Klassifizierung einer Risikoschwangerschaft führten

- **Gravidogramm:** Fundusstand, Kindslage, Vorhandensein von Ödemen, Körpergewicht, systolischer und diastolischer Blutdruck, Hämoglobinkonzentration, Urinuntersuchungen (Proteinurie, Glukosurie) im Schwangerschaftsverlauf
- **Geburtsdaten:** Geburtsdatum, Gestationsalter bei der Geburt in vollendeten Schwangerschaftswochen bzw. –tagen, Geburtsmodus (spontane Vaginalgeburt, vaginal operative Geburt, primäre bzw. sekundäre Sectio caesarea), Kindslage, Geburtsgewicht, Geschlecht, Länge und Kopfumfang des Neugeborenen, postpartaler Nabelarterien pH-Wert, APGAR–Werte nach einer, fünf und zehn Minuten

### 3.2.2. Asservierung von mütterlichem Blut

Zur späteren Genotypisierung wurden bei allen Studienteilnehmerinnen im Rahmen der Routineblutuntersuchungen jeweils 9 ml venöses Blut entnommen. Dazu wurden sterile Röhrchen mit 1,6 mg Kalium-EDTA-Lösung verwendet. Die Röhrchen wurden anschließend mit Namen und Geburtsdatum der Mutter versehen. Später wurden diese Daten durch eine Probandennummer ersetzt, um die Anonymität der Studienteilnehmerinnen zu gewährleisten.

## 3.3. Methoden

Die im folgenden beschriebenen Laborarbeiten umfassen die DNA-Präparation aus Vollblut, die Amplifikation von Nukleoidsequenzen mittels PCR, den Restriktionsverdau der PCR-Produkte und die Interpretation der Ergebnisse mit Hilfe der Gelelektrophorese.

### 3.3.1. DNA-Isolierung aus Vollblut

Die DNA-Präparation beruht auf dem Prinzip der Erythrozytenlyse und der Leukozytenlyse mit nachfolgender Fällung von Nukleinsäuren. Ausgangsmaterial zur Gewinnung von Desoxyribonukleinsäure war das EDTA-Vollblut der Studienteilnehmerinnen (EDTA ist wichtig als Komplexbildner mit  $Mg^{2+}$ -Ionen, welche als mögliche Kofaktoren von Nukleasen fungieren können).

Die Proben wurden mit 3.000 Umdrehungen pro Minute (Upm) für fünf Minuten zentrifugiert. Es ergaben sich zwei Phasen: eine untere Zellphase und eine obere Plasmaphase. Die Plasmaphase wurde abpipettiert und verworfen und die Zellen 1:1 mit 0,9 %iger NaCl-Lösung versetzt.

Ziel war es nun, Hämoglobin und damit das im Hämoglobin enthaltene Porphyrin und Hämation zu entfernen. Dazu wurden zunächst 50 µl des Zell-NaCl-Gemisches mit 500 µl TE-Puffer als Erythrozyten-Lysepuffer versetzt.

#### TE-Puffer zur Erythrozytenlyse

*10 mM Tris-Cl*

*1 mM EDTA mit pH 7,5 zur optimalen Löslichkeit*

Es folgte eine dreiminütige Zentrifugation bei 13.000 Umdrehungen pro Minute, bei der die lymphozytären Zellen als weißer Niederschlag pelletierten. Der hämolytische Überstand wurde verworfen und das verbliebene Pellet mit 500 µl TE-Puffer resuspendiert. Nach erneuerter Zentrifugation bei 13.000 Upm für 1 Minute wurde der Überstand erneuert verworfen und der Vorgang so lange wiederholt, bis sich das Pellet hellgelb färbte. In der Regel geschah dies nach 3-4 Durchgängen. Der letzte Überstand wurde mit einer Pipette vollständig entfernt und das Pellet mit 100 µl K-Puffer resuspendiert, welcher das proteolytische Enzym Proteinase K enthält. Dieses denaturierende Detergenz erfüllte gleich zwei wichtige Aufgaben: es lysierte die Zellmembran und die Kernmembran der Leukozyten und legte damit die Nukleinsäuren frei. Gleichzeitig denaturierte es weitgehend die Enzyme der Zelle.

#### K-Puffer zur Leukozytenlyse

*50 mM KCL, 10 mM Tris-Cl*

*2,5 mM MgCl bei pH 8,3*

*0,5 % Tween 20*

*100 µl/ml Proteinase K*

*(Herstellung am Tag der Probenaufbereitung)*

Das Gemisch wurde bei 56 °C in einem Thermoblock für mindestens 45 Minuten inkubiert. Abschließend wurde es in einem zweiten Thermoblock auf 95 °C für 10 Minuten erhitzt. Nach Beendigung des Vorganges mussten die Proben rasch auf Eis und bei -20 °C gelagert werden.

### 3.3.2. Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Im April 1983 erfand Kary Mullis in Kalifornien das Prinzip der PCR. 1993 bekam er dafür den Nobelpreis für Medizin [94].

Die PCR ist eine *in vitro* Technik, mit der gezielt Desoxyribonukleinsäure-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, vervielfältigt werden können. Um DNA mit Hilfe einer PCR amplifizieren zu können, werden als Starthilfe Oligonukleotide, sogenannte Primer, benötigt, die an die Enden der DNA-Sequenz binden. Bei den Primern handelt es sich um kurze, einsträngige DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz auf dem *Template* (Original) -DNA-Strang sind. Die Reaktion basiert auf einer Auftrennung der doppelsträngigen DNA („Melting“), der Anlagerung („*Anneling*“) und der nachfolgenden Verlängerung („*Elongation*“) von zwei Oligonukleoidprimern unterschiedlicher Sequenz.

1. „*Melting*“: Nach Hitzedenaturierung der doppelsträngigen DNA bei 94 °C trennen sich die DNA-Stränge vollständig voneinander. Sie bilden Einzelstränge, die zu Matrizen für die Primer und die DNA-Polymerase werden.
2. „*Anneling*“: Danach wird die Lösung abgekühlt, so dass sich die Primer an dem jeweiligen komplementären DNA-Strang anlagern können. Der erste Primer bindet an das komplementäre Sequenzende eines DNA-Stranges, der andere Primer in gewisser Entfernung am Genstrang. Sie flankieren damit das zu amplifizierende DNA-Segment. Die *Anneling*-Temperatur bestimmt entscheidend die Spezifität einer PCR.
3. „*Elongation*“: Im nächsten Schritt wird die Temperatur auf 72 °C erhöht. Dies ist die optimale Temperatur der Taq-Polymerase. Mit Hilfe dieser DNA-Polymerase findet die Extension entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize statt. In Gegenwart von vier in Puffer gelösten Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) und unter den richtigen Reaktionsbedingungen synthetisieren die angelagerten Taq-Polimerasen neue DNA-Stränge,

deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Die Primerextension verläuft in 3'-5'-Richtung von der jeweiligen 3'-Hydroxylgruppe in Richtung des anderen Primers. Die neu gebildeten DNA-Moleküle liegen am Ende der Reaktion doppelsträngig vor.

Die drei Teilschritte bilden einen einzelnen PCR-Zyklus, der sich kontinuierlich wiederholt. Die neu synthetisierten Stränge stehen dabei nun ebenfalls als Matrizen zur Verfügung. So entstehen millionenfache Kopien der Zielregion. Die Konzentration der Zielsequenz steigt bei jedem neuen Zyklus exponentiell. Mit jedem Zyklus verdoppelt sich die Anzahl der DNA-Kopien, und in aller Regel wird der Zyklus 20-40 Mal wiederholt. Die PCR-Produkte tragen an den Enden immer die Oligonukleotidsequenz der Primer.

### DNA Doppelstrang

Das sogenannte Template enthält die zu vermehrende DNA-Sequenz. Die Enden der Ziel-DNA sind komplementär zu den Primer-Sequenzen.

### Oligonukleotidprimer

Zur Polymorphismus-Analyse des NOS3-Gens mit Hilfe der Polymerase-Ketten-Reaktion wurden Oligonukleotidprimer mit den folgenden flankierenden Sequenzen eingesetzt:

Primer NOS3 Sense 5'-CAT GAG GCT CAG CCC CAG AAC

Primer NOS3 Antisense 5'-AGT CAA TCC CTT TGG TGC TCA C

Die Vervielfältigung der DNA beginnt dort, wo sich der Primer anlagert, und läuft stets von 5' nach 3'(bezogen auf den Primer).

Die Primer werden chemisch synthetisiert und sind je 21 bzw. 22 Basenpaare lang. Ihre optimale Anlagerungstemperatur beträgt 62-65 °C. Die kodierende Sequenzvariante ist ein G-T-Polymorphismus in Exon 7 in Codon 298 des NOS3-Gens, welcher für eine Aminosäurenveränderung von Glutamat zu Aspartat kodiert. Der Primer flankiert also das zu amplifizierende Exon 7.

### Taq DNA-Polymerase

Zur Vervielfältigung des Exon 7 des NOS3-Gens wurde das am häufigsten verwendete Enzym zur Amplifizierung von DNA verwendet, die Taq-DNA-Polymerase. Sie stellt einen komplementären Strang zum Template her. Das Enzym ist verhältnismäßig hitzestabil und wird

gentechnisch hergestellt. Ursprünglich wurde die DNA-Polymerase aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert, welches man in einer heißen Quelle des Yellowstone Nationalparks fand. Das pH-Optimum liegt für die Taq-Polymerase bei 8,3-9. Ihre Synthesegeschwindigkeit liegt bei ca. 60 bp/s.

#### Puffersystem

Es wurde Standardpuffer verwendet. Jeweils 3 µl wurden pro PCR-Ansatz eingesetzt.

#### Desoxyribonukleotide

Die vier Desoxyribonukleosidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) wurden in Konzentrationen von 100 mM verwendet. Für die PCR wurden jeweils 0,06 µl davon eingesetzt.

Für die PCR wurden 1 µl Original-DNA vorgelegt.

#### Mastermix für Template (n+1)

<i>Wasser</i>	<i>21,66 µl</i>
<i>Puffer 10 x</i>	<i>3 µl</i>
<i>MgCl 25 mM</i>	<i>1,8 µl</i>
<i>dATP 100 mM</i>	<i>0,06 µl</i>
<i>dCTP 100 mM</i>	<i>0,06 µl</i>
<i>dGTP 100 mM</i>	<i>0,06 µl</i>
<i>dTTP 100 mM</i>	<i>0,06 µl</i>
<i>Nos Primer Sense 10-15 µM</i>	<i>1 µl</i>
<i>Nos Primer Antisense 10-15 µM</i>	<i>1 µl</i>
<i>Taq-Polymerase 5 U/µl</i>	<i>0,3 µl</i>

Der sogenannte Mastermix wurde vorbereitet und die Taq-Polymerase zuletzt zugegeben. Anschließend wurde kurz gemischt und anzentrifugiert und jeweils 29 µl Ansatz zu den DNA-Vorlagen gegeben. Nach nochmaligem Anzentrifugieren der Proben wurden diese rasch in den PCR-Thermocycler gestellt und das entsprechende Programm gestartet. Bei jedem PCR-Ansatz wurde eine Negativ-Kontrolle mit Wasser an Stelle der Ziel-DNA mitgeführt.

### Programm für Thermocycler

12 min 95 °C

30 sec 94 °C

1 min 72 °C

7 min 72 °C

Pause 4 °C

35 Zyklen

Deckeltemperatur 105 °C

### 3.3.3. Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse

Die mit Hilfe der PCR amplifizierte DNA wurde einer Restriktions-Fragment-Längen-Polymorphismus-Analyse mit der Restriktionsendonuklease Mbo I 5'... G A T C ...3', 3'... C T A G ... 5' unterzogen. Die Quelle des Enzyms ist *Moraxella bovis*. Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die eine Nukleotidabfolge auf doppelsträngiger DNA erkennen und die hydrolytische Spaltung beider DNA-Stränge an dieser Stelle bewirken. Stimmen Erkennungssequenz und Schnittstelle überein wird für die Restriktion kein ATP benötigt. Die Mbo I spaltet spiegelbildlich an der Erkennungsregion des DNA-Stranges; dadurch entstehen sogenannte „sticky ends“. Das Restriktionsenzym besteht aber nicht nur aus der Nuklease, sondern auch aus einer zweiten Komponente, der Methylase. Durch Methylierung der Basen an der Erkennungsstelle der Endonuklease schützt sie die DNA vor der Verdauung durch eigene Restriktionsenzyme. Dieses Enzym fungiert als dam-Methylase, d. h. es fügt Methylgruppen (CH<sub>3</sub>) an das N6 des Adennukleotids in folgender Sequenz an: '5 GATC 3'.

Es wurden 10 µl des gekühlten PCR-Produktes für den Restriktionsverdau vorgelegt.

### Mix für das PCR-Produkt

Wasser            7,8 µl

Buffer R+        2 µl

Mbo I             0,2 µl

Der Mix wurde aufgrund der Temperaturempfindlichkeit der Verdauungsenzyme rasch zu den PCR-Proben gegeben und an zentrifugiert. Nun wurden die Proben bei 37 °C im Wasserbad für mindestens vier und höchstens 20 Stunden verdaut.

### 3.3.4. Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient zur Visualisierung der entstandenen Restriktionsfragmente. DNA-Fragmente werden auf der Agarose-Gelelektrophorese in erster Linie nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt: kleine Fragmente wandern im elektrischen Feld weiter in das Gel als große; die Agarose stellt dabei eine dreidimensionale Matrix mit Siebeffekt dar. Da das erwartete PCR-Produkt nur 206 Basenpaare bzw. 119 und 87 Basenpaare (bp) lang ist, wird ein 2,5 %iges Agarosegel verwendet, welches einen optimalen Trennungsbereich linearer DNA in diesem Bereich bietet. Mit Hilfe von Fragmenten bekannter Länge (Größenmarker-DNA) läßt sich eine Eichkurve aufstellen. Als Molekulargewichtsmarker wurde die 1 kb DNA-Leiter verwendet. Zur Herstellung dieses Gels wurde 2,5 g Agarose in 100 ml 1 x TBE-Puffer durch Kochen in der Mikrowelle gelöst und mit eingesetztem Taschenkamm in den Gelträger gegossen.

#### 10 x TBE-(Tris-Borat-EDTA)-Puffer:

<i>TRIS</i>	<i>108 g/l</i>
<i>Borsäure</i>	<i>55 g/l</i>
<i>0,5 M EDTA bei pH 8,0 in Aqua bidest gelöst</i>	<i>40 ml/l</i>

Nach Erstarren und Einsetzen des Gels in die mit 1 x TBE-Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer wurden 5 µl des PCR-Amplifikates mit 4 µl Blaumarker und die Mischung in die vom Taschenkamm gebildeten Slots aufgetragen.

#### Blaumarker:

<i>Bromphenolblau</i>	<i>0,25 %</i>
<i>Xylencyanol</i>	<i>0,25 %</i>
<i>Glycerin</i>	<i>30 %</i>
<i>mit Aqua bidest aufgefüllt</i>	

Es wurden 60 Proben auf ein Gel aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Wasserkontrollspur eingefügt, um Kontaminationen sichtbar zu machen. Die Proben liefen bei einer konstant angelegten Spannung von 100 V für 30 - 60 Minuten. Anhand des Farbstoffes Bromphenolblau konnte der Lauf der DNA optisch verfolgt werden. Anschließend wurde das Gel für 15 Minuten in Ethidiumbromidlösung gefärbt, einem Farbstoff, der zwischen die Basen der Nukleinsäuren bindet.

#### Ethidiumbromidlösung:

*0,5 µl/ml Ethidiumbromid in 500 ml 1x TBE*

Zur Reduzierung der Hintergrundfluoreszenz durch freies Ethidiumbromid und zur besseren Analyse komplexer DNA-Bandenmuster wurde das Gel in Wasser entfärbt. Abschließend wurden die Proben unter UV-Licht sichtbar gemacht und ausgewertet.

Das Ergebnis der Analyse war folgendes: Das 206 bp PCR-Produkt war in Gegenwart von Thymidin (T) bei Nukleotid 894 in 119 bp und 87 bp Fragmente geschnitten. Dieses T auf Nukleotid 894 entspricht Aspargin (Asp) auf dem Codon 298 des NOS3-Gens. Es entstanden also folgende Banden: Glutamin (Glu) ergab eine Bande bei 206 Basenpaaren und Aspargin (Asp) zwei Banden bei 119 und 87 Basenpaaren.

#### 3.3.5.        Verwendete Chemikalien, Materialien und Geräte

Es wurden kommerziell verfügbare Standard-PCR Techniken und Materialien verwendet

- Agarose - Amresco, Solon, Ohio, USA
- Ampli-Taq-Gold-DNA-Polymerase mit GeneAmp 10 x PCR Buffer II und MgCl<sub>2</sub>-Lösung - Applied Biosystems by Roche Molecular Systems, Inc., Branchburg, New Jersey, USA
- Biozentrifuge - Heraeus Instruments GmbH, Berlin
- Borsäure, Glycerin und Bromphenolblau - Merck KGaA, Darmstadt

- Combitips plus, 0,1 ml, Polypipetten verschiedener Größen, Pipettenspitzen verschiedener Größen, Safe-Lock Tubes, 1,5/ 2 ml, Varipetten - Eppendorf GmbH, Hamburg
- dNTPs - Abgene House, Epsom, Surrey KT19 9AP, UK
- Feinwaage Typ H16 Mettler - Spoerhase AG, Gießen
- Gelkammer, Thermocycler und Transilluminator TII - Biometra, Biomed. Analytik GmbH, Göttingen
- Kryo-Aufbewahrungsbox - NeoLab Migge GmbH, Heidelberg
- Mbo1 5'... G A T C ...3', 3'... C T A G ... 5', Quelle *Moraxella bovis* und Buffer R+ - Fermentas, Waltham, Massachusetts, USA
- PCR-Reaktionsgefäße ultradünn, 0,2 ml und PCR-Deckel Safeseal T.I.P.S. Premium - Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
- Primer NOS3 Sense 5'-CAT gAg gCT CAg CCC Cag AAC, Primer NOS3 Antisense 5'-AgT CAA TCC CTT Tgg TgC TCA C - TIB MOBIOL, Berlin
- Proteinkinase K, gewonnen aus *Tritirachium album* - Roche Diagnostics GmbH + Co. KG, Mannheim
- Thermostat TCR 100 und TRIS - Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe
- Tischwaage Sartorius BL 600 - Sartorius AG, Göttingen
- Vortex Genie 2 - Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
- Wasserbad GFL Typ 1013 - Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel

### 3.4. Statistische Auswertung

Die Analyse der vorliegenden Daten wurde mit SPSS 11.0.3 for Mac OS X (englische Version) durchgeführt. Die Resultate der kontinuierlichen Variablen sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung angegeben. Als parametrischer Test für Mittelwertunterschiede einer Variablen zwischen den Genotypen wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet. Das Hardy-Weinberg-Gesetz wurde angewendet, um die Genotypenverteilung bzw. die Allelfrequenz zu ermitteln. Die kategorialen Daten wurden mit dem Chi-Quadrat-Test nach Pearson verglichen. Die Kovarianzanalyse (ANCOVA) wurde verwendet, um den Einfluß von unterschiedlichen Variablen auf den Blutdruck während der Schwangerschaft zu untersuchen. Die Signifikanz wurde für alle Tests auf 5 % festgelegt ( $p < 0,05$ ).

## 4. Ergebnisse der statistischen Auswertung

### 4.1. Beschreibung des Studienkollektivs

#### 4.1.1. Daten aus dem Mutterpass

##### Alter

Das mittlere Alter der Mütter bei Geburt ihres Kindes betrug  $30 \pm 5,6$  Jahre ( $n = 2.099$ ).

##### Body-Mass-Index

Der mittlere Body-Mass-Index (BMI) der Mütter lag bei Schwangerschaftsbeginn bei  $23,8 \pm 4,6$  kg/m<sup>2</sup> ( $n = 1.845$ ).

##### Körpergewicht bezogen auf das Trimenon der Schwangerschaft

Das Körpergewicht der Mütter im ersten Trimenon betrug im Mittel  $64,8 \pm 13,0$  kg ( $n = 1.903$ ).

Im zweiten Trimenon lag das Körpergewicht im Mittel bei  $69,0 \pm 12,0$  kg ( $n = 2.164$ ).

Im dritten Trimenon hatten die Mütter ein mittleres Gewicht von  $76,0 \pm 12,4$  kg ( $n = 2.157$ ).

##### Ödeme bezogen auf das Trimenon der Schwangerschaft

Im ersten Trimenon waren bei 35 Müttern (1,9 %) Ödeme vorhanden ( $n = 1.814$ ). Im zweiten Trimenon lagen bei 232 Müttern (11,0 %) Ödeme vor ( $n = 2.114$ ). Im dritten Trimester fanden sich schließlich bei 746 Müttern (35,3 %) Ödeme ( $n = 2.115$ ).

##### Proteinurie bezogen auf das Trimenon der Schwangerschaft

Im ersten Trimenon fand sich bei 261 Müttern (14,8 %) eine Proteinurie ( $n = 1.758$ ). Im zweiten Trimenon stieg die Anzahl der Mütter mit Proteinurie auf 517 (25,7 %) ( $n = 2.013$ ) und im dritten Trimenon betrug die Anzahl der Mütter mit einer Proteinurie immerhin 702 (35,4 %) ( $n = 1.985$ ).

##### Arterielle Hypertonie bezogen auf das Trimenon der Schwangerschaft

Im ersten Trimenon der Schwangerschaft zeigten 44 Mütter (2,3 %) einen erhöhten systolischen Blutdruck ( $n = 1.915$ ). Im zweiten Trimenon nur noch 11 Mütter (0,5 %) ( $n = 2.165$ ) und im dritten Trimenon 20 Mütter (0,9 %) ( $n = 2.161$ ).

## Gravida

Die große Mehrheit der Studienteilnehmerinnen (n = 2.193) waren Erstgravida, nämlich 900, entsprechend 41,0 %. Für 624 Mütter (28,5 %) war es die zweite Schwangerschaft, für 293 (13,4 %) die dritte, für 150 (6,8 %) die vierte, für 62 Müttern (2,8 %) die fünfte Schwangerschaft.

### 4.1.2. Daten zu den geborenen Kindern

1136 der geborenen Kinder waren männlich (51,8 %) und 1010 weiblich (46,1 %). Von 47 Kindern war das Geschlecht nicht bekannt. Die Kinder kamen im Durchschnitt in der 39. ± 2,2 Woche zur Welt und ihr Gewicht lag im Mittel bei 3.380 ± 610 g.

1421 der Geburten waren Spontangeburt (64,8 %). 565 der geborenen Kinder (25,8 %) kamen per Sectio Caesarea zur Welt. Vaginale operative Geburten lagen bei 145 (6,6 %) der untersuchten Fälle vor. Bei 62 Müttern konnten keine Daten zum Geburtsmodus erhoben werden.

### 4.1.3. Anamnestisch erhobene Daten

#### Tabakkonsum vor und während der Schwangerschaft

Die Mehrheit der Mütter hatte noch nie regelmässig Tabak konsumiert, nämlich 60,4 % (n = 1879). 744 Frauen (39,6 %) gaben an, schon geraucht zu haben. Davon haben 425 Frauen (22,6 %) nur vor der Schwangerschaft geraucht und 319 Frauen (17,0 %) vor und auch während der Schwangerschaft.

#### Fettstoffwechselstörung und die Einnahme von Lipidsenkern

Fettstoffwechselstörungen lagen nur bei 32 der Mütter (1,7 %) vor (n = 1877). Anamnestisch nahmen nur 3 (0,2 %) der Befragten Lipidsenker ein (n = 1874).

#### Familienanamnese mit arterieller Hypertonie

640 Mütter (34,3 %) gaben an, dass sie von einem bzw. mehreren an arteriellem Hypertonus erkrankten Familienmitgliedern wüssten (n = 1865).

#### Diabetes mellitus vor der Schwangerschaft

37 Mütter (2,0 %) waren schon vor der Schwangerschaft an einem Diabetes mellitus erkrankt (n = 1875).

#### Diabetes mellitus in der Schwangerschaft

62 Mütter (3,3 %) erkrankten während der Schwangerschaft an einem Diabetes mellitus (n = 1874).

#### Familienanamnese mit Diabetes mellitus

598 der befragten Mütter (32,0 %) gaben an, daß ihnen mindestens ein Fall von Diabetes mellitus in ihrer Familie bekannt sei (n = 1871).

## 4.2. Genotypenverteilung und Allelverteilung

Zur Untersuchung des G894T-Polymorphismus des NOS3-Gens wurden die Studienteilnehmerinnen in den homozygoten Genotyp GG, in den heterozygoten Genotyp GT und in den homozygoten Genotyp TT unterteilt. Des Weiteren wurden die Mütter unterteilt in Allelträgerinnen (TT + GT) und Nichtallelträgerinnen (GG). Bei 361 Müttern ist der Genotyp unbekannt, das entspricht 16,5 % der Studienteilnehmerinnen.

---

G894T	Häufigkeit
Genotyp GG	901 (49,2 %)
Genotyp GT	781 (42,6 %)
Genotyp TT	150 (8,2 %)
G-Allelfrequenz	0,706 ± 0,01
T-Allelfrequenz	0,294 ± 0,01
Chi-Quadrat-Test	2,1
<i>p</i>	0,14

---

*Tabelle 1. Verteilung der Genotypen und Allelfrequenzen der Studienteilnehmerinnen*

### 4.3. Charakteristika der Mütter in Bezug auf den G894T-Polymorphismus

Es wurden die deskriptiven Daten zwischen den mütterlichen Genotypen verglichen. Hierfür wurde die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) verwendet.

#### 4.3.1. Alter und Body-Mass-Index

Bei den Mittelwerten des Alters, der Größe und des BMI der Mütter fanden sich zwischen den Genotypen keine signifikanten Unterschiede.

---

G894T	Alter (in Jahren)	BMI (in kg/m <sup>2</sup> )
GG	30,0 ± 5,5 (n = 861)	23,8 ± 4,1 (n = 775)
GT	30,0 ± 5,5 (n = 743)	24,0 ± 4,0 (n = 673)
TT	30,5 ± 5,0 (n = 145)	23,8 ± 4,2 (n = 124)

---

*Tabelle 2. Mittelwerte von Alter und BMI der Studienteilnehmerinnen in Bezug auf ihren Genotyp*

#### 4.3.2. Diabetes mellitus

Beim Auftreten eines Diabetes mellitus während der Schwangerschaft zeigte sich eine signifikant höhere Erkrankungsrate bei homozygoten Allelträgern TT ( $p = 0,04$ ). Auch vor der Schwangerschaft lag bei diesem Genotyp die Erkrankungsrate höher, jedoch nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Bei familienanamnestisch erfragtem Diabetes mellitus lagen keine Unterschiede zwischen den Genotypen vor.

---

G894T	Diabetes mellitus vor der Schwangerschaft
-------	---

---

GG (n = 786)	12 (1,5 %)
--------------	------------

GT (n = 681)	13 (1,9 %)
--------------	------------

TT (n = 126)	3 (2,4 %)
--------------	-----------

---

*Tabelle 3. Häufigkeit von Diabetes mellitus der Studienteilnehmerinnen vor der Schwangerschaft bezogen auf den Genotyp*

---

G894T	Diabetes mellitus während der Schwangerschaft
-------	---

---

GG (n = 786)	20 (2,5 %)
--------------	------------

GT (n = 680)	25 (3,7 %)
--------------	------------

TT (n = 126)	8 (6,3 %)
--------------	-----------

---

*Tabelle 4. Häufigkeit von Diabetes mellitus der Studienteilnehmerinnen während der Schwangerschaft bezogen auf den Genotyp*

G894T	Positive Familienanamnese für Diabetes mellitus
GG (n = 785)	249 (31,7 %)
GT (n = 679)	227 (33,4 %)
TT (n = 126)	40 (31,7 %)

*Tabelle 5. Häufigkeiten von anamnestisch erhobenem Diabetes mellitus in der Familie der Studienteilnehmerinnen bezogen auf den Genotyp*

#### 4.3.3. Positive Familienanamnese für arterielle Hypertonie

Bei der Angabe einer arteriellen Hypertonie in der Familie der Studienteilnehmerinnen zeigte sich kein signifikant höheres Auftreten der Erkrankung beim homozygoten Genotyp TT als bei den anderen beiden Genotypen ( $p > 0,05$ ).

G894T	Arterieller Hypertonus in der Familie
GG (n = 781)	242 (31,0 %)
GT (n = 678)	243 (35,8 %)
TT (n = 124)	51 (41,1 %)

*Tabelle 6. Häufigkeit der arteriellen Hypertonie in der Familie der Studienteilnehmerinnen bezogen auf den Genotyp*

#### 4.3.4. Fettstoffwechselstörungen

Beim Auftreten von Fettstoffwechselstörungen bei den Müttern gab es keine Unterschiede zwischen den NOS3-Genotypen.

---

G894T	Fettstoffwechselstörungen
GG (n = 788)	14 (1,8 %)
GT (n = 681)	10 (1,5 %)
TT (n = 126)	2 (1,6 %)

---

*Tabelle 7. Häufigkeit von Fettstoffwechselstörungen der Studienteilnehmerinnen bezogen auf den Genotyp*

#### 4.3.5. Nikotinkonsum

Das Rauchverhalten der Studienteilnehmerinnen unterschied sich in Bezug auf ihren Genotyp nicht. Tabakkonsum als Störfaktor bei der Untersuchung von Präeklampsie und G894T-Polymorphismus konnte also ausgeschlossen werden.

---

G894T	Nikotin nur vor der SS	Nikotin vor/während der SS
GG (n = 788)	183 (23,2 %)	128 (16,2 %)
GT (n = 683)	143 (20,9 %)	121 (17,7 %)
TT (n = 126)	29 (23,0 %)	20 (15,9 %)

---

*Tabelle 8. Nikotinkonsum in Bezug auf den Genotyp*

#### 4.4. Arterieller Blutdruck, Proteinurie und Ödembildung in Abhängigkeit des mütterlichen Genotyps

##### 4.4.1. Ödeme

Ödeme treten nur im ersten Semester bei Müttern mit dem heterozygoten Genotyp häufiger auf, jedoch ist dies nicht als signifikant zu werten ( $p > 0,05$ ). Im weiteren Verlauf der Schwangerschaft verliert der Unterschied an Deutlichkeit.

---

G894T	Ödeme im 1. Trimenon
GG (n = 755)	13 (1,7 %)
GT (n = 622)	16 (2,6 %)
TT (n = 134)	1 (0,7 %)

---

---

G894T	Ödeme im 2. Trimenon
GG (n = 870)	92 (10,6 %)
GT (n = 748)	90 (12,0 %)
TT (n = 144)	15 (10,4 %)

---

G894T	Ödeme im 3. Trimenon
GG (n = 869)	313 (36,0 %)
GT (n = 746)	270 (36,2 %)
TT (n = 145)	51 (35,2 %)

*Tabelle 9. Vergleich von Studienteilnehmerinnen mit und ohne Ödeme in Bezug auf den Genotyp im ersten, zweiten und dritten Trimenon der Schwangerschaft*

#### 4.4.2. Arterieller Blutdruck

Die Ergebnisse zu Mittelwerten des systolischen Blutdrucks der Studienteilnehmerinnen zeigen, dass sich zu keinem Zeitpunkt der Schwangerschaft Unterschiede im Bezug auf den NOS3-Genotyp abzeichnen.

G894T	RR systolisch $\pm$ Standardabweichung in mmHg		
	1. Trimenon	2. Trimenon	3. Trimenon
GG	114 $\pm$ 11 (n = 796)	113 $\pm$ 10 (n = 888)	115 $\pm$ 12 (n = 887)
GT	115 $\pm$ 12 (n = 669)	114 $\pm$ 10 (n = 774)	115 $\pm$ 10 (n = 770)
TT	115 $\pm$ 11 (n = 137)	113 $\pm$ 11 (n = 148)	115 $\pm$ 10 (n = 147)
<i>p</i>	0,45	0,38	0,98

*Tabelle 10. Mittelwerte des systolischen Blutdrucks der Studienteilnehmerinnen in Beziehung zum Genotyp im ersten, zweiten und dritten Trimenon*

Gleich verhält es sich bei Betrachtung der Ergebnisse von Mittelwerten des diastolischen Blutdrucks der Mütter. Es ergeben sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen, weder im ersten, noch im zweiten oder dritten Trimenon der Schwangerschaft.

G894T	RR diastolisch ± Standardabweichung in mmHg		
	1. Trimenon	2. Trimenon	3. Trimenon
GG	68 ± 8 (n = 795)	67 ± 7 (n = 888)	69 ± 7 (n = 887)
GT	69 ± 8 (n = 669)	67 ± 7 (n = 774)	69 ± 7 (n = 770)
TT	69 ± 9 (n = 137)	67 ± 8 (n = 148)	69 ± 8 (n = 147)
<i>p</i>	0,25	0,46	0,58

*Tabelle 11. Mittelwerte des diastolischen Blutdrucks der Studienteilnehmerinnen in Beziehung zum Genotyp im ersten, zweiten und dritten Trimenon*

#### 4.4.3. Proteinurie

Auch bei der Untersuchung von Mittelwerten der Proteinurie bezogen auf das Trimenon der Schwangerschaft ergaben sich keine Unterschiede zwischen den Genotypen.

G894T	Proteinurie (% ohne Proteinurie / 1+ / > 1+ im Urinteststreifen)		
	1. Trimenon	2. Trimenon	3. Trimenon
GG (n = 737)	89/10/1	79/20/1	71/26/3
GT (n = 647)	88/11/1	75/22/2	69/27/4
TT (n = 118)	91/8/1	87/12/2	77/19/4
<i>p</i>	0,80	0,05	0,38

*Tabelle 12. Mittelwerte der Proteinurie der Studienteilnehmerinnen in Bezug auf den Genotyp im ersten, zweiten und dritten Trimenon*

#### 4.4.4. Kovarianzanalyse

Es wurde eine Kovarianzanalyse (ANCOVA) hinsichtlich der Beeinflussung der Ergebnisse durch Alter, Body-Mass-Index (BMI) und Primigravidität durchgeführt. Es zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen.

	1. Trimenon	2. Trimenon	3. Trimenon
RR systolisch	$p = 0,45$	$p = 0,38$	$p = 0,98$
RR diastolisch	$p = 0,25$	$p = 0,46$	$p = 0,59$
Proteinurie	$p = 0,80$	$p = 0,86$	$p = 0,38$

*Tabelle 13. Mittelwertvergleiche des systolischen und diastolischen Blutdrucks und der Proteinurie zwischen den Genotypen, Kovarianzanalyse (ANCOVA)*

4.4.5. Unterteilung in Allelträger und Nichtallelträger

Auch bei der Unterteilung der Genotypen in Allelträger (GT + TT) und Nichtallelträger (GG) ergaben sich keine signifikanten Unterschiede des systolischen und diastolischen Blutdrucks, sowie der Proteinurie in den einzelnen Trimestern der Schwangerschaft.

RR systolisch ± Standardabweichung in mmHg			
G894T	1. Trimenon	2. Trimenon	3. Trimenon
GG	114 ± 11 (n = 796)	113 ± 10 (n = 888)	115 ± 10 (n = 887)
GT + TT	115 ± 12 (n = 806)	114 ± 10 (n = 922)	115 ± 10 (n = 917)
<i>p</i>	0,30	0,26	0,87

RR diastolisch ± Standardabweichung in mmHg			
G894T	1. Trimenon	2. Trimenon	3. Trimenon
GG	68 ± 8 (n = 795)	67 ± 7 (n = 888)	69 ± 7 (n = 887)
GT + TT	69 ± 8 (n = 806)	67 ± 7 (n = 922)	70 ± 7 (n = 917)

<i>p</i>	0,10	0,40	0,72
----------	------	------	------

*Tabelle 14. Unterteilung der Genotypen in Allelträger und Nichtallelträger in Bezug zum systolischen und diastolischen Blutdruck und der Proteinurie*

## 5. Zusammenfassung der Ergebnisse der statistischen Auswertung

Der NOS3-G894T-Polymorphismus scheint bei der Entwicklung einer arteriellen Hypertonie und einer Proteinurie in der Schwangerschaft nicht relevant zu sein. Die Vergleiche der Mittelwerte von systolischem und diastolischem Blutdruck sowie der Proteinurie in Bezug auf den jeweiligen Genotyp (GG, GT, TT) erbrachten allesamt Werte, die deutlich oberhalb der Signifikanzgrenze von  $p = 0,05$  lagen. Auch bei der Unterteilung in Allelträger (TT, GT) und Nichtallelträger (GG) lagen keine Unterschiede bei der Entwicklung von Bluthochdruck und Proteinurie vor. Die Mittelwerte lagen ebenfalls alle deutlich über der Signifikanzgrenze. Eine Assoziation des NOS3-G894T-Polymorphismus mit der Präeklampsie erscheint somit unwahrscheinlich.

Die deskriptiven Daten unserer Studienpopulation wurden mit den Genotypen verglichen. Signifikante Unterschiede der Genotypen in Bezug auf Alter, BMI, Fettstoffwechselstörungen, Nikotinmissbrauch und einer positiven Familienanamnese für Diabetes mellitus und arterieller Hypertonie ergaben sich nicht. Auch das Auftreten von peripheren Ödemen scheint nicht mit dem Genotyp assoziiert zu sein. Bei der Erkrankung von Diabetes mellitus während der Schwangerschaft zeigte sich allerdings ein signifikant höheres Auftreten beim homozygoten Genotyp TT.

## 6. Diskussion

Die vorliegende Arbeit dient der Überprüfung der Hypothese, ob eine genetisch determinierte NO-abhängige Pathogenese von hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft besteht. Es wurden die Effekte eines maternalen Polymorphismus des NOS3-Gens (G894T) auf klassische Marker der Präeklampsie wie Bluthochdruck und Proteinurie untersucht. Zudem wurde der Zusammenhang zur peripheren Ödembildung analysiert.

Um klinisch messbare Effekte in einer Population von Frauen mit einer zumeist normal verlaufenden Schwangerschaft festzustellen, wurde für die vorliegende Arbeit eine große Zahl (n = 2.193) schwangerer Frauen rekrutiert. In der untersuchten Population unterschied sich die Verteilung der Allele für das Gen nicht signifikant von vorangegangenen Untersuchungen an deutschen bzw. anderen kaukasischen Populationen [94,95].

### 6.1. Die Bedeutung des eNOS-Polymorphismus in der Schwangerschaft

Es gilt als gesichert, dass NO im Rahmen einer normalen Schwangerschaft erhöht ist [95]. Der Anstieg der Produktion von NO scheint für die maternale Vasodilatation notwendig zu sein. Die Vasodilatation verhindert einen Anstieg des Blutdrucks der Schwangeren. Bei der Präeklampsie scheint diese Adaptation nicht hinreichend zu funktionieren [96], der Blutdruck steigt an und es entwickelt sich eine Proteinurie. Der NOS3-G894T-Polymorphismus wurde mit einer reduzierten Produktion von NO in Zusammenhang gebracht [97] und scheint auch bei der Adaptation des Kreislaufs der Schwangeren eine Rolle zu spielen [98].

Die Resultate der vorliegenden Arbeit zeigen keine Assoziation der maternalen NOS3-Variante und klinischen Markern einer Präeklampsie.

Der mittlere Blutdruck in den drei verschiedenen Trimestern zeigt im Vergleich der unterschiedlichen Genotypen keinen signifikanten Unterschied.

Die Proteinurie unterscheidet sich ebenfalls nicht signifikant zwischen den Genotypen.

Ebenso besteht kein signifikanter Unterschied für die untersuchten Genotypen hinsichtlich neu aufgetretener peripherer Ödeme.

Weitere häufig untersuchte eNOS-Polymorphismen (T786C und VNTR 4a/b) und ein Polymorphismus des Renin-Angiotensin-Systems wurden in unserer Arbeitsgruppe analysiert und zeigten, in Übereinstimmung mit anderen Studien, ebenfalls keine statistische Signifikanz [99,100].

## 6.2. Vergleich mit anderen wissenschaftlichen Arbeiten

Eine in der Türkei durchgeführte und 2015 publizierte Studie untersuchte 80 gesunde Schwangere und 80 Schwangere mit Schwangerschaftshypertonus bzw. Präeklampsie. Auch hier wurden die Auswirkungen eines G894T-Polymorphismus des eNOS-Gens analysiert. Ein signifikanter Unterschied konnte ebenfalls nicht festgestellt werden [101]. Auch weitere Studien mit der gleichen Fragestellung konnten keine Assoziation feststellen [102,103].

Im Gegensatz dazu steht eine Fall-Kontroll-Studie aus dem Jahr 2014, die an einer Population in Nordindien vorgenommen wurde. Hier wurden 300 Frauen mit Präeklampsie und 200 gesunde schwangere Frauen untersucht und der Einfluss des gleichen eNOS-Polymorphismus analysiert. Hier war die mRNA-Expression des eNOS-Gens signifikant niedriger bei den präeklampsischen Frauen [104]. Ebenfalls 2014 wurde eine chinesische Population mit dem gleichen Studiendesign untersucht und zeigte ein vergleichbares Ergebnis [105].

Inzwischen liegen einige Metaanalysen zu diesem Thema vor. Auch diese zeigten inkongruente Ergebnisse.

In eine Metaanalyse von 2013 wurden 33 Studien mit insgesamt 10.671 Teilnehmerinnen eingeschlossen, um den Zusammenhang von Präeklampsie und dem eNOS-Polymorphismus besser zu verstehen. Die Assoziation zwischen der G894T-Variante und einem erhöhten Risiko einer Präeklampsie war statistisch signifikant [106].

Eine weitere 2016 publizierte Metaanalyse mit 36 eingeschlossenen Fall-Kontroll-Studien und insgesamt 11.700 Probandinnen zeigte keine Assoziation zwischen schwangerschaftsinduziertem Hypertonus und der G894T-Variante der eNOS. In einer Subgruppenanalyse konnte jedoch gezeigt werden, dass bei Europäerinnen und Amerikanerinnen keine Assoziation vorlag, jedoch Asiatinnen mit einem eNOS-Gen-G894T-Polymorphismus offensichtlich einem erhöhten Risiko für eine schwangerschaftsinduzierte Hypertonie unterliegen [107].

### 6.3. Erklärungsansätze für die unterschiedlichen Studienergebnisse

Was sind die Ursachen für die inkongruenten Studienergebnisse in Bezug auf den eNOS-Polymorphismus?

Der ethnische Hintergrund von Studienteilnehmerinnen spielt eine wichtige Rolle bei genetischen Assoziationsstudien. Unsere Resultate stehen in Übereinstimmung mit größeren Fall-Kontroll-Studien zum G894T-Polymorphismus an kaukasischen Populationen [101-103].

Die Pathogenese von hypertensiven Erkrankungen in der Schwangerschaft ist multifaktoriell und die analysierte genetische Variante reflektiert vermutlich nur einen kleinen Teil davon. Der Lebensstil der Probanden und die Umwelteinflüsse spielen dabei ebenfalls eine entscheidende Rolle. So wurden Einflüsse von Klimaveränderungen [108], Luftverschmutzung [109] und Ernährung [110] auf unterschiedliche Kollektive untersucht. Der sozioökonomische Status ist ebenfalls ein häufig beschriebener Faktor in der Prädisposition zur Entwicklung von hypertensiven Erkrankungen bei Schwangeren [111].

Das unterschiedliche Studiendesign mag ein weiterer Grund für die divergenten Ergebnisse der Untersuchungsreihe sein. Die Einschlusskriterien waren sehr variabel. Verschiedene Risikofaktoren wie Adipositas, eine erste Schwangerschaft und eine positive Familienanamnese für arteriellen Hypertonus beeinflussen das Studiendesign und die nachfolgenden Ergebnisse [112].

## 7. Zusammenfassung

Es wurde in der vorliegenden Arbeit der maternale NOS3-G894T-Polymorphismus hinsichtlich klinischer Marker der Präeklampsie untersucht.

Die Untersuchung dieser großen kaukasischen Population zeigte keinen Zusammenhang zwischen den unterschiedlichen Genotypen und der Blutdruckregulation, Proteinausscheidung und Ödembildung während der Schwangerschaft. Die Arbeit steht in Einklang mit Untersuchungen vieler Arbeitsgruppen [101-103] und im Widerspruch mit den Ergebnissen einiger anderer Studien [104,105]. Die unterschiedlichen Resultate sind durch die komplexe Pathogenese der schwangerschaftsbedingten Hypertonie bedingt. Sie können durch ethnische Unterschiede, unterschiedlichen Lebensstile und Umweltbedingungen beeinflusst werden. Zudem liegen unterschiedliche Studiendesigns vor.

Diese Faktoren müssen bei der weiteren Erforschung des schwangerschaftsbedingten Hypertonus berücksichtigt werden.

Neben dem G894T-Polymorphismus wurde die in dieser Arbeit beschriebene Population weiter untersucht und eine Genotypisierung des T789C-Allels und des Intron 4a/b-Allels vorgenommen. Auch hier konnten keine signifikanten Unterschiede von Blutdruck, Proteinurie und peripheren Ödemen zwischen den Genotypen gefunden werden [99].

Bei der Charakterisierung der Studienteilnehmerinnen fand sich jedoch eine signifikant höhere Erkrankungsrate von Diabetes mellitus während der Schwangerschaft bei den homozygoten Allelträgern TT. Die Assoziation des G894T-Polymorphismus mit Diabetes mellitus bei Schwangeren erfordert offensichtlich weiterführende Untersuchungen.

## 8. Quellenangaben

- 1 Keßler H. *NO*. Die Zeit, Ausgabe 43/1998
- 2 Griffith OW, Stuehr DJ. *Nitric oxide synthase: Properties and catalytic mechanism*. Annu Rev Physiol 1995; (57):707-36.
- 3 Klimm J, Bein TH, Fröhlich S. *Stickstoffmonoxid (NO)-physiologische und biochemische Bedeutung*. Anaest Intensivmed 1992; (5):115-123.
- 4 Busse R, Fleming I, Schini VB. *Nitric oxide formation in the vascular wall: regulation and functional implications*. Curr Top Microbiol Immunol 1995; 196:7-18. Review.
- 5 Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van Goor H. *Protective role of endothelial nitric oxide synthase*. J Pathol 2003; 199(1):8-17.
- 6 Moncada S, Palmer RM, Higgs EA. *Nitric Oxide. Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology*. Pharmacological Rev 1991; (43/2):109-142.
- 7 Ochoa JB, Udekwu AO, Billiar TR, Curran RD, Cerra FB, Simmons RL, Peitzman AB. *Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis*. Ann Surg 1991; 214(5):621-6.
- 8 Marletta MA, Yoon PS, Iyengar R, Leaf CD, Wishnok JS. *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochemistry 1988; 27(24):8706-11.
- 9 Iyengar R, Stuehr DJ, Marletta MA. *Macrophage synthesis of nitrite, nitrate, and N-nitrosamines: precursors and role of the respiratory burst*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(18):6369-73.

- 10 Ghosh DK, Abu-Soud HM, Stuehr DJ. *Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase*. *Biochemistry* 1995; 34(36):11316-20.
- 11 Gross SS, Wolin MS. *Nitric oxide: pathophysiological mechanisms*. *Annu Rev Physiol* 1995; 57:737-69.
- 12 Schmidt HH, Hofmann H, Ogilvie P. *Regulation and dysregulation of constitutive nitric oxide synthases types I and III*. *Curr Top Microbiol Immunol* 1995; 196:75-86 .
- 13 Miles AM, Owens MW, Milligan S, Johnson GG, Fields JZ, Ing TS, Kottapalli V, Keshavarzian A, Grisham MB. *Nitric oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes*. *J Leukoc Biol* 1995; 58(5):616-22.
- 14 Förstermann U. *Regulation of nitric oxide synthase expression and activity*. In: Mayer B, ed. *Nitric oxide. Handbook of experimental Pharmacology*. 1 edition, 2000; 71-83.
- 15 Schumann EM, Madison DV. *Nitric oxide and synaptic function*. *Annu rev neurosci* 1994; 17:153-83.
- 16 Dimmler S, Zeiher AM. *Cytotoxicity, apoptosis, and nitric oxide*. In: Loscalzo J, Vita J. *Nitric oxide and the cardiovascular system*. USA: Humana Press, 2000; 69-84.
- 17 McNaughten L, Radomski A, Sawocki G, Radomski MW. *Regulation of Plated Funktion*. In: Mayer B, ed. *Nitric oxide. Handbook of experimental Pharmacology*. 1 edition, 2000; 235-257.
- 18 Loscalzo J. *Nitric Oxide Insufficiency, Platelet Activation, and Arterial Thrombosis*. *Circulation Research* 2001, 88:756-762.

- 19 Fernon O, Michel T. Cell and molecular biology of nitric oxide synthases. In: Loscalzo J, Vita J. *Nitric oxide and the cardiovascular system*. USA: Humana Press, 2000; 11-31.
- 20 Umans J.G., R. Levi. *Nitric oxide in the regulation of blood flow and arterial pressure*. *Ann Rev Physiol* 1995; (57):771-90.
- 21 Huang A, Keaney JF. *Antioxidants and endothelium-derived nitric oxide action*. In: Loscalzo J, Vita J. *Nitric oxide and the cardiovascular system*. USA: Humana Press, 2000; 473-503.
- 22 Eberhardt RT, Loscalzo J. *Nitric oxide in Artherosclerosis*. In: Loscalzo J, Vita J. *Nitric oxide and the cardiovascular system*. USA: Humana Press, 2000; 273-296.
- 23 Nathan C, Xie Q. *Regulation of Biosynthesis of Nitric oxide*. *J Biol Chem* 1994; (269):13725-28.
- 24 Ramasamy S, Drummond GR, Ahn J, Storek M, Pohl J, Parthasarathy S, Harrison DG. *Modulation of Expression of eNOS by Nordihydroguaiaretic Acid, a Phenolic Antioxidant in Cultured Endothelial Cells*. *Mol Pharm* 1999; (56/1):116-123.
- 25 Michell BJ, Chen Z, Tiganis T. *Coordinated control of endothelial nitric oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependant protein kinase*. *JBC* 2001; (276/21):17625-28.
- 26 Janssens SP, Shimouchi A, Quertermous T, Bloch DB, Bloch KD. Cloning and expression of a cDNA encoding human endothelium-derived relaxing factor/nitric oxide synthase. *J Biol Chem* 1992; 267(21):14519-22.
- 27 Shoyi M, Tsutaya S, Saito R, Takamatu H, Yasujima M. *Positive association of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism with hypertension in northern Japan*. *Life Sci*. 2000; 66(26):2557-62.

- 28 Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N. *Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension*. Hypertension 1998;32(1):3-8.
- 29 Wolff B, Grabe HJ, Schluter C, Popowski K, Völzke H, Lüdemann J, John U, Felix SB, Cascorbi I. *Endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp gene polymorphism, blood pressure and hypertension in a general population sample*. J Hypertens 2005;23(7):1361-6.
- 30 Tsujita Y, Baba S, Yamauchi R, Mannami T, Kinoshita M, Yamamoto R, Katsuya T, Higaki J, Ogihara T, Ogata J, Iwai N. *Association analyses between genetic polymorphisms of endothelial nitric oxide synthase gene and hypertension in Japanese: The Suita Study*. J Hypertens 2001;19(11):1941-8.
- 31 Veldman BA, Spiering W, Doevendans W, Vervoort G, Kroon AA, de Leeuw PW, Smits P. *The Glu298Asp polymorphism of the NOS 3 gene as a determinant of the baseline production of nitric oxide*. J Hypertens 2002; 20(10):2023-7.
- 32 Griscavage JM, Rogers NE, Sherman MP, Ignarro LJ. *Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide*. J immunol 1993; (151/11):6329-37.
- 33 Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Yasue H, Okamura H. *The missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene is strongly associated with placental abruption*. Hum Genet 2001; 108(3):181-3.
- 34 Smith GCS, Pell JP, Walsh D. *Pregnancy complications and maternal risk of ischaemic heart disease: a retrospective cohort study of 129290 births*. Lancet 2001; 357:2002–6.
- 35 Busse R, Fleming I. *Nitric oxide and regulation of vascular tone*. In: Mayer B, ed. Nitric oxide. Handbook of experimental Pharmacology. 1 edition, 2000; 179-206.
- 36 Duvekot, J.J. and Peeters, L.L. *Renal haemodynamics and volume homeostasis in pregnancy*. Obstet. Gynecol. Surv. 1994; 49: 830–839

- 37 Robson, S.C., Hunter, S., Boys, R.J., and Dunlop, W. *Serial study of factors influencing changes in cardiac output during human pregnancy*. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 1989; 256: H1060–H1065.
- 38 Facchinetti F, Longo M, Piccinini F, Neri I, Volpe A. *L-Arginine infusion reduces blood pressure in preeclamptic women through nitric oxide release*. J Soc Gynecol Invest 1999; 6(4):202-7.
- 39 Facchinetti F, De Martis S, Neri I. *Effect of transdermalglyceryltrinitrate on 24-h blood pressure changes in patients with gestational hypertension*. Prenat Neonat Med 1997; 2:22-8
- 40 Smulders RA, Aarsen M, Teerlink T. *Haemodynamic and biochemical response to l-Arg and l-lysine infusion in normal subjects: l-Arg-induced vasodilatation cannot be explained by non-specific effects of cationic amino acids*. Clin Sci 1997; 92:367-74.
- 41 Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. *Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology*. Pharmacol Rev 1991; 43:109-42.
- 42 Macdonald AA, Rose J, Heymann MA, Rudolph AM. *Heart rate response of fetal and adult sheep to hemorrhage stress*. Am J Physiol 1980; 239:789-93.
- 43 Jouppila P, Kirkinen P, Koivula A. *Labetalol does not alter the placental and fetal blood flow or maternal prostanoids in preeclampsia*. Br J Obstet Gynaecol 1985; 93: 543-7.
- 44 Jouppila P, Kirkinen P, Koivula A, Ylikorkala O. *Failure of exogenous prostacyclin to change placental and fetal blood flow in preeclampsia*. Am J Obstet Gynecol 1985; 151: 661-5.
- 45 Grunewald C, Kublickas M, Carlstrom K, Lunell NO, Nisell H. *Effects of nitroglycerine on the uterine and umbilical circulation in severe preeclampsia*. Obstet Gynecol 1995; 86: 600-4.

- 46 Di Iulio JL, Gude NM, King RG, Brennecke SP. *Human placental and fetal membrane nitric oxide synthase activity before, during and after labour at term.* *Reprod Fertil Dev* 1995; 7(6):1505-8.
- 47 Conrad KP, Joffe GM, Kruszyna H, Kruszyna R, Rochelle LG, Smith RP, Chavez JE, Mosher MD. *Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats.* *FASEB J* 1993; 7(6):566-71 .
- 48 Yallampalli C, Garfield RE. *Inhibition of nitric oxide synthesis in rats during pregnancy produces signs similar to those of preeclampsia.* *Am J Obstet Gynecol* 1993; 169(5):1316-20.
- 49 Molnar M, Suto T, Toth T, Hertelendy F. *Prolonged blockade of nitric oxide synthesis in gravid rats produces sustained hypertension, proteinuria, thrombocytopenia, and intrauterine growth retardation.* *Am J Obstet Gynecol* 1994; 170:1458-66.
- 50 Ronzoni S, Marconi AM, Cetin I, Paolini CL, Teng C, Pardi G, Battaglia FC. *Umbilical amino acid uptake at increasing maternal amino acid concentrations: effect of maternal amino acid infusate.* *Am J Obstet Gynecol* 1999; 181:477-83.
- 51 Helmbrecht GD, Farhat MY, Lochbaum L, Brown HE, Yadgarova KT, Eglinton GS, Ramwell PW. *L-Arginin reverses the adverse pregnancy changes induced by nitric oxide synthase inhibition in the rat.* *Gynecol* 1996; 175:800-5.
- 52 McCarthy AL, Woolfson RG, Raju SK, Poston L. *Abnormal endothelial cell function of resistance arteries from women with preeclampsia.* *Am J Obstet Gynecol* 1993; 168(4):1323-30.
- 53 Pascoal IF, Lindheimer MD, Nalbantian-Brandt C, Umans JG. *Preeclampsia selectively impairs endothelium-dependent relaxation and leads to oscillatory activity in small omental arteries.* *J clin Invest* 1998; 101(2):464-70.
- 54 Suzuki Y, Yamamoto T, Suzumori K, Kajikuri J, Itoh T. *Modified histamine-*

- induced NO-mediated relaxation in resistance arteries in preeclampsia. Eur J Pharmacol* 2000; 410(1):7-13.
- 55 Sladek SM, Magness RR, Conrad KP. *Nitric oxide and pregnancy. Am J Physiol* 1997; 272:441-63 .
- 56 Magness RR, Rosenfeld CR, Hassan A. *Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. I. Effects of ANGII on PGI2 and NO in pregnancy. Am J Physiol* 1996; 270:1914-23.
- 57 Magness RR, Shaw CE, Phernetton TM. *Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. II. Pregnancy effects on NO synthase expression. Am J Physiol* 1997; 272:1730-40.
- 58 Alexander BT, Kassab SE, Miller MT, Abram SR, Reckelhoff JF, Bennett WA, Granger JP. *Reduced uterine perfusion pressure during pregnancy in the rat is associated with increases in arterial pressure and changes in renal nitric oxide. Hypertension* 2001; 37(4):1191-5.
- 59 Crews JK, Herrington JN, Granger JP, Khalil RA. *Decreased endothelium dependant vascular relaxation during reduction of uterine perfusion pressure in pregnant rat. Hypertension* 2000; 35:367-72.
- 60 Gude NM, King RG, Brennecke SP. *Role of endothelium-derived nitric oxide in maintenance of low fetal vascular resistance in placenta. Lancet* 1990; 336(8730):1589-90.
- 61 Myatt L, Brewer AS, Langdon G, Brockman DE. *Attenuation of the vasoconstrictor effects of thromboxane and endothelin by nitric oxide in the human fetal-placental circulation. Am J Obstet Gynecol* 1992; 166:224-30.
- 62 Wieczorek KM, Brewer AS, Myatt L. *Shear stress may stimulate release and action of nitric oxide in the human fetal-placental vasculature. Am J Obstet Gynecol* 1995; 173:708-13.

- 63 Sladek SM, Regenstein AC, Lykins D, Roberts JM. *Nitric oxide synthase activity in pregnant rabbit uterus decreases on the last day of pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1993; 169(5):1285-91.
- 64 Telfer JF, Lyall F, Norman JE, Cameron IT. *Identification of nitric oxide synthase in human uterus*. Hum Reprod 1995, 10(1):19-23.
- 65 *Report of the Nation High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 2000; 183(1):1-22.
- 66 Conrad, KP, Joffe GM, Kruszyna H. *Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats*. FASEB J 1993; 7:566-57.
- 67 Lindheimer MD, Taler ST, Tunningham FG. *Hypertension in pregnancy*. Journal of the American Society of Hypertension 2008; 2(6):484-494.
- 68 Page EW, Christianson R. *The impact of mean arterial pressure in the middle trimester upon the outcome of pregnancy*. Am J Obstet Gynecol 1976; 125:740.
- 69 Helewa ME, Burrows RF, Smith J, Williams K, Brain P, Rabkin SW. *Report of the National High Blood Pressure Education Program Working Group on High Blood Pressure in Pregnancy*. Am J Obstet Gynecol. 2000; 183(1):S1-S22.
- 70 Roberts JM, Redman CWG. *Pre-eclampsia: More than pregnancy-induced hypertension*. Lancet 1993; 341:1447-51.
- 71 Phipps EA, Thadhani R, Benzing T, Karumanchi SA. *Pre-eclampsia: pathogenesis, novel diagnostics and therapies*. Nat Rev Nephrol. 2019 Feb 21. [Epub ahead of print] Review.
- 72 Pijnenborg R, Anthony J, Davey DA. *Placental bed spiral arteries in the hypertensive disorders of pregnancy*. Br J Obstet Gynaecol 1991; 98:648-55.

- 73 Pinto A, Sorrentino R, Sorrentino P. *EDRF (NO) released by endothelial cells of human umbilical vessels*. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 164:507-13.
- 74 Cockell AP, Poston L. *Flow-mediated vasodilatation is enhanced in normal pregnancy but reduced in pre-eclampsia*. *Hypertension* 1997; 30:247-51.
- 75 Deng A, Engels K, Baylis C. *Impact of nitric oxide deficiency on blood pressure and glomerular hemodynamic adaptations to pregnancy in the rat*. *Kidney Int* 1996; 50:1132-8.
- 76 Grant NF, Daley GL, Chand S, Whalley PJ, McDonald PC. *A study of angiotensin II pressor response throughout primigravid pregnancy*. *J Clin Invest* 1973; pp. 2682–2689.
- 77 Downing I, Shepherd GL, Lewis PJ. *Reduced prostacyclin production in pre-eclampsia*. *Lancet* 1980; 2:1374.
- 78 Roberts JM, Taylor RM, Goldfein A. *Clinical and biochemical evidence of endothelial cell dysfunction in pre-eclampsia*. *Am J Hypertens* 1991; 4:700-8.
- 79 Redman CWG, Denson KW, Bellin LJ, Bolton FG, Stirrat GM. *Factor-VII consumption in pre-eclampsia*. *Lancet* 1977; 2:1249.
- 80 Taylor RN, Crombleholme WR, Friedman SA, Jones LA, Casal DC, Roberts JM. *High plasma cellular fibronectin levels correlate with biochemical and clinical features of pre-eclampsia but cannot be attributed to hypertension alone*. *Am J Obstet Gynecol* 1991; 165:895-901.
- 81 Marik PE. *Hypertensive Disorders of Pregnancy*. *Postgrad Med* 2009; 121(2):69-76.
- 82 Myatt L, Miodovnik M. *Prediction of preeclampsia*. *Semin Perinatol* 1999; 23(1):45-57. Review.

- 83 National High Blood Pressure Education Program. *Working Group report on high blood pressure in pregnancy*. National Institutes of Health, USA, 2000.
- 84 Sibai B. M. *Drug Therapy: Treatment of Hypertension in Pregnant Women*. *N Engl J Med* 1996; 335:257-265.
- 85 Davies AM. Epidemiology to the hypertensive disorders of pregnancy. *Bulletin of the World Health Organization* 1979; 57(3):373-386.
- 86 Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Shimasaki Y, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K. *Endothelial nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension*. *Hypertension* 1998; 32: 3□8.
- 87 Niu W, Qi Y. *An updated meta-analysis fo endothelial nitric oxide synthase gene: three well-characterized polymorphisms with hypertension*. *PLOS ONE* 2011; 6:242-266.
- 88 Yasujim M, Tsutaya S, Shoji M. *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and hypertension*. *Rinsho Byori* 1998; 46:1199-1204.
- 89 Yoshimura T, Yoshimura M, Tabata A, Shimasaki Y, Nakayama M, Miyamoto Y, Saito Y, Nakao K, Yasue H, Okamura H. *Association of the missense Glu298Asp variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with severe preeclampsia*. *J Soc Gynecol Investig* 2000; 7(4):238-41.
- 90 Landau R, Xie HG, Dishy V, Wood AJ, Stein CM, Smiley RM. *No association of the Asp298 variant of the endothelial nitric oxide synthase gene with preeclampsia*. *American Journal of Hypertension* 2004; 17:391-4.
- 91 Yoshimura T, Chowdhury FA, Yoshimura M, Okamura H. *Genetic and environmental contributions to severe preeclampsia: lack of association with the*

- endothelial nitric oxide synthase Glu298Asp variant in a developing country.* Gynecol Obstet Invest 2003; 56(1):10-3.
- 92 Hakli T, Romppanen EL, Hiltunen M, Helisalmi S, Punnonen K, Heinonen S. *Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia.* J Soc Gynecol Investig 2003; 10(3):154-7.
- 93 Paul Rabinow. *Making PCR, A Story of Biotechnology.* University of Chicago Press, 1996.
- 94 van Onna M, Kroon AA, Houben AJ, Koster D, Zeegers MP, Henskens LH, Plat AW, Stoffers HE, de Leeuw PW. *Genetic risk of atherosclerotic renal artery disease: the candidate gene approach in a renal angiography cohort.* Hypertension. 2004; 44(4):448-53.
- 95 Wolff B, Braun C, Schlüter C, Grabe HJ, Popowski K, Völzke H, Lüdemann J, John U, Cascorbi I. *Endothelial nitric oxide synthase Glu(298)->Asp polymorphism, carotid atherosclerosis and intima-media thickness in a general population sample.* Clin Sci (Lond). 2005;109(5):475-81.
- 96 Lopez-Jaramillo P, Narvaez M, Calle A. *Cyclic guanosine 3',5'monophosphate concentrations in preeclampsia: effects of hydralazine.* Br J Obstet Gynaecol 1996; 103:33–38.
- 97 Savvidou MD, Hingorani AD, Tsikas D, Frölich JC, Vallance P, Nicolaides KH. *Endothelial dysfunction and raised plasma concentrations of asymmetric dimethylarginine in pregnant women who subsequently develop pre-eclampsia.* Lancet 2003; 361:1511–1517.
- 98 Tesouro M, Thompson WC, Rogliani P, Qi L, Chaudhary PP, Moss J. *Intracellular processing of endothelial nitric oxide synthase isoforms associated with differences in severity of cardiopulmonary diseases: cleavage of proteins with aspartate vs. glutamate at position 298.* Proc Natl Acad Sci USA 2000; 6:2832–2835.

- 98 Savvidou MD, Vallance PJ, Nicolaides KH, Hingorani AD. *Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and maternal vascular adaptation to pregnancy*. Hypertension 2001; 38:1289–1293.
- 99 Hocher B, Chen YP, Hügle S, Repey J, Krause K, Slowinski T, Godes M, Schaeffeler E, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Gossing G, Pfab T. *Impact of maternal endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy*. J Hum Hypertension 2008; 22 (9): 641-7.
- 100 Pfab T, Stirnberg B, Sohn A, Krause K, Slowinski T, Godes M, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Hocher B. *Impact of maternal angiotensinogen M235T polymorphism and angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy*. J Hypertens. 2007; 25(6):1255-61.
- 101 Sakar MN, Atay AE, Demir S, Bakir VL, Demir B, Balsak D, Akay E, Ulusoy AI, Verit FF. *Association of endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and serum nitric oxide levels in patients with preeclampsia and gestational hypertension*. J Matern Fetal Neonatal Med. 2015; 28(16):1907-11.
- 102 Rahimi Z, Aghaei A, Rahimi Z, Jalilvand F, Parsian A. *Endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) 4a/b and G894T Polymorphisms and Susceptibility to Preeclampsia*. J Reprod Infertil. 2013; 14(4):184-9.
- 103 Häkli T, Romppanen EL, Hiltunen M. *Endothelial nitric oxide synthase polymorphism in preeclampsia*. J Soc Gynecol Investig. 2003; 10(3):154-7.
- 104 Sharma D, Hussain SA, Akhter N, Singh A, Trivedi SS, Bhattacharjee J. *Endothelial nitric oxide synthase (eNOS) gene Glu298Asp polymorphism and expression in North Indian preeclamptic women*. Pregnancy Hypertens. 2014 Jan; 4(1):65-9.

- 105 Chen Y, Wang D, Zhou M, Chen X, Chen J. *Polymorphisms of the endothelial nitric oxide synthase gene in preeclampsia in a Han Chinese population*. Gynecol Obstet Invest. 2014; 77(3):150-5.
- 106 Dai B, Liu T, Zhang B, Wang Z. *The polymorphism for endothelial nitric oxide synthase gene, the level of nitric oxide and the risk for pre-eclampsia: a meta-analysis*. Gene. 2013; 519(1):187-93.
- 107 Ma Q, Lv J, Huang K, Guo H, Yang W, Luo W, Qiu J, Yang L. *Endothelial nitric oxide synthase gene G894T polymorphism and risk assessment for pregnancy-induced hypertension: evidence from 11700 subjects*. Hypertens Res. 2016; 39(12):899-906.
- 108 Verburg PE, Dekker GA, Tucker G, Scheil W, Erwich JJHM, Roberts CT. *Seasonality of hypertensive disorders of pregnancy - A South Australian population study*. Pregnancy Hypertens. 2018; 12:118-123.
- 109 Wang Q, Zhang H, Liang Q, Knibbs LD, Ren M, Li C, Bao J, Wang S, He Y, Zhu L, Wang X, Zhao Q, Huang C. *Effects of prenatal exposure to air pollution on preeclampsia in Shenzhen, China*. Environ Pollut. 2018; 237:18-27.
- 110 Christian P, Mullany LC, Hurley KM, Katz J, Black RE. *Nutrition and maternal, neonatal, and child health*. Semin Perinatol. 2015; 39(5):361-72.
- 111 Sarwar MS, Sarkar RC, Bhowmick R, Dewan SM, Ahmed MU, Hasnat A, Rashid M, Islam MS. *Effect of socio-economic status and estimation of lipid peroxidation and antioxidant in preeclamptic pregnant women: a case-control study*. Hypertens Pregnancy. 2015; 34(1):125-35.
- 112 Kobashi G, Shido K, Hata A, Yamada H, Kato EH, Kanamori M, Fujimoto S, Kondo K. *Multivariate analysis of genetic and acquired factors; T235 variant of the angiotensinogen gene is a potent independent risk factor for preeclampsia*. Semin Thromb Hemost 2001; 27:143-47.

## 9. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Sophia Hügler, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Auswirkungen des eNOS-G894T-Polymorphismus auf den Blutdruck und die Proteinurie bei Schwangeren“ selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass mir die Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis bekannt ist und ich mich zur Einhaltung dieser Satzung verpflichte.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

22.05.2019

Unterschrift

## Ausführliche Anteilserklärung an der erfolgten Publikation durch Sophia Hügler

Hoher B, Chen YP, Hügler S, Repey J, Krause K, Slowinski T, Godes M, Schaeffele E, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Gossing G, Pfab T. *Impact of maternal endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy*. J Hum Hypertension 2008; 22 (9): 641-7.

### Beitrag im Einzelnen:

- Konzeption des Studiendesigns unter Supervision von Prof. Dr. Berthold Hoher
- Eigenständige Rekrutierung der Probanden und Erfassung der Mutterpässe mit Interview der Wöchnerinnen im Team von vier Doktoranden
- Organisation und Durchführung der Experimente zur Untersuchung des NOS3-G894T-Polymorphismus
- Datenerfassung: Primäre Erfassung der Daten aus den Mutterpässen sowie der Ergebnisse aus der Untersuchung des NOS3-G894-Polymorphismus in Aktenform. Digitalisierung der Daten (SPSS und Windows-Excel).
- Statistische Auswertung der Daten unter der Supervision von Prof. Dr. Berthold Hoher

---

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers

---

Unterschrift der Doktorandin

## 10. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11. Publikation

Hocher B, Chen YP, Hügle S, Repey J, Krause K, Slowinski T, Godes M, Schaeffele E, Guthmann F, Wauer R, Halle H, Gossing G, Pfab T. *Impact of maternal endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms on blood pressure, protein excretion and fetal outcome in pregnancy.* J Hum Hypertension 2008; 22 (9): 641-7.

## 12. Danksagung

Mein erster Dank gilt Prof. Dr. Berthold Hocher, der mir das Thema der Arbeit überlassen hat und in dessen Labor diese Arbeit entstanden ist.

Prof. Dr. Stanislao Morgera danke ich für die Motivation, mich dem Thema erneuert anzunehmen. Seinem Optimismus und seiner Unterstützung ist die Fertigstellung dieser Arbeit zu verdanken.

Großer Dank gilt meinem Freund Tobias, der immer an mich glaubt, und meinen Kindern Greta, Luise und Magdalene, die meinem zeitaufwendigen beruflichen Werdegang immer mit einer großen Selbstverständlichkeit begegneten.

Vielen Dank möchte ich meinen Eltern sagen. Sie haben mich mit großer Zuneigung unterstützt und mir ein sorgenfreies Studium sowie diese Dissertation ermöglicht. Ihnen ist diese Arbeit gewidmet.